

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biochemie



Hanuš Boháček

Agregace proteinů býčí semenné plazmy
Aggregation of Bull Seminal Plasma Proteins

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za jeho vedení a pomoc při řešení této práce.

Dále bych rád poděkoval celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a cenné rady.

Poděkovat bych chtěl také své rodině za podporu jak morální, tak finanční.

Abstract

Mammalian fertilization is a sequence of unique and fascinating events, during which seminal proteins are of crucial role. In case of bull (*Bos taurus*), proteins of seminal plasma (BSP), especially its major component PDC-109, are known to be in aggregated forms, but little is known about mechanism of forming aggregates and their biological function. In present thesis we discovered some interesting properties of PDC-109 and BSP proteins. We found that concentration of these proteins influences their aggregation state significantly, which can be of great biological importance. Separation of seminal proteins by size exclusion chromatography revealed three main fractions denoted I, II and III, with apparent molecular weights of $M_r > 150\,000$, $M_r = 30\,000$ and $M_r = 13\,000$, respectively. In case of PDC-109, molecular weights of these fractions were retained even after purification procedure, which implies very stable interactions in forming of aggregates. In addition, there was a difference in distribution of PDC-109 glycoforms among fractions, which can be related to the fact, that these fractions have different sperm membrane binding patterns as we determined by fluorescence microscopy. However, further experiments are needed for better understanding this issue.

Keywords: PDC-109, BSP, bull, seminal plasma, aggregation, fertilization, protein

Abstrakt

Savčí fertilizace je jedinečný a fascinující sled událostí, v němž se významně uplatňují seminální proteiny. Je známo, že v případě býka (*Bos taurus*) se proteiny semenné plazmy (BSP), zvláště pak jejich majoritní složka PDC-109, nacházejí v agregovaných stavech, ale o mechanismu tvorby agregátů a jejich biologické funkci se příliš mnoho neví. Z výsledků této práce vyplývají některé zajímavé vlastnosti PDC-109 a BSP. Zjistili jsme, že koncentrace těchto proteinů má značný vliv na jejich agregaci, což může mít důležitý biologický význam. Separace seminálních proteinů gelovou chromatografií odhalila existenci tří hlavních frakcí, označených I, II a III, odpovídajících relativním molekulovým hmotnostem $M_r > 150\,000$, $M_r = 30\,000$ a $M_r = 13\,000$, resp. Jejich molekulové hmotnosti jsou zachovány i po purifikační proceduře v případě PDC-109, což naznačuje velmi stabilní interakce, zahrnuté ve formaci agregátů. Navíc byla v jednotlivých frakcích rozdílná distribuce glykoforem PDC-109, jež může souviset s jejich odlišným vazebným chováním k membráně spermie, což jsme zjistili pomocí fluorescenční mikroskopie. Nicméně k lepšímu pochopení studované problematiky je zapotřebí dalších experimentů.

Klíčová slova: PDC-109, BSP, býk, semenná plazma, agregace, fertilizace, protein

Obsah

1.	Úvod.....	8
1.1	Pohlavní soustava býka	8
1.2	Stavba a vývoj samčí pohlavní buňky býka	9
1.2.1	Stavba spermie	9
1.2.2	Spermatogeneze	10
1.2.3	Zrání spermie - epididymální maturace	10
1.3	Interakce spermie s prostředím samičího genitálního traktu.....	11
1.3.1	Tvorba ovidukálního rezervoáru.....	11
1.3.2	Kapacitace.....	11
1.3.3	Akrosomová reakce a fúze gamet	12
1.4	Býčí semenná plazma.....	13
1.4.1	Nízkomolekulární složky býčí semenné plazmy	13
1.4.2	Proteiny býčí semenné plazmy	13
1.5	BSP proteiny	15
1.5.1	Struktura BSP proteinů	16
1.5.2	Vazebné vlastnosti BSP proteinů.....	18
1.5.3	Biologická funkce BSP proteinů.....	22
1.5.4	Agregace BSP proteinů.....	26
1.6	Cíl práce	27
2.	Materiál a metody	28
2.1	Materiál	28
2.1.1	Biologický materiál.....	28
2.1.2	Chemikálie	28
2.1.3	Ostatní materiál.....	30
2.2	Metody	31
2.2.1	Purifikace PDC-109 na DEAE-Sephadexu A-25	31
2.2.2	Gelová chromatografie	31
2.2.3	Biotinylace BSP a PDC-109	33
2.2.4	Značení PDC-109 fluorescein-thioisokyanátem (FITC).....	33
2.2.5	Enzymatická deglykosylace PDC-109.....	34
2.2.6	ELBA (Enzyme-Linked Binding Assay).....	35
2.2.7	SDS-PAGE	36
2.2.8	RN-PAGE (Red Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	37
2.2.9	Detekce proteinů v gelu po elektroforéze - barvení CBB.....	38
2.2.10	Detekce proteinů v gelu po elektroforéze - barvení stříbrem	38
2.2.11	Detekce glykoproteinů v gelu po elektroforéze - barvení stříbrem	39
2.2.12	Želatinová zymografie	39
2.2.13	Stanovení obsahu neutrálních cukrů dle Duboise	40
2.2.14	Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	40
2.2.15	Fluorescenční mikroskopie	41
3.	Výsledky	42
3.1	Purifikace PDC-109 na DEAE-Sephadexu A25	42
3.2	Srovnání BSP a PDC-109 na gelové chromatografii	43
3.3	Vliv vybraných fyzikálních parametrů na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109.....	44
3.3.1	Vliv koncentrace proteinů na jejich agregaci	44
3.3.2	Vliv pH na agregaci BSP a PDC-109	46
3.3.3	Vliv iontové síly na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109	47

3.4	Vliv přítomnosti některých nízkomolekulárních látek na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109	49
3.4.1	Vliv přítomnosti Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , EDTA a citrátu na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109	49
3.4.2	Vliv přítomnosti D-Glc, D-Fru, D-Gal, D-Man, L-Fuc a <i>myo</i> -Ins na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109	55
3.4.3	Vliv přítomnosti fosforylcholinu a merkapt ethanolu na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109	59
3.5	Analýza separovaných frakcí BSP a PDC-109	61
3.6	Vliv glykosylace PDC-109 na jeho agregaci	68
4.	Diskuze	71
5.	Závěr	74
6.	Seznam použitých zkratek	75
7.	Literatura.....	77

1. Úvod

Schopnost reprodukce je jedním z charakteristických znaků života. Při pohlavním rozmnožování dochází ke splnutí dvou odlišných haploidních gamet (samčí spermie a samičího vajíčka) za vzniku geneticky unikátní diploidní zygoty. U savců vznikají gamety v gonádách procesem gametogeneze. Během tohoto procesu se morfologicky i funkčně diferencují. K úspěšnému kontaktu a splnutí dojde pouze mezi zralými gametami ve vhodném čase a prostředí [1, 2].

1.1 Pohlavní soustava býka

Pohlavní soustava býka (*Bos taurus*) sestává z varlat, nadvarlat, pyje a přídatných pohlavních žláz - chámovodů, prostaty, Cowperových (bulbouretrálních) žláz a semenných vaků [1].

Ve varlatech (*testes*) vznikají spermie procesem spermatogeneze a je zde také tvořen testosteron [1]. Parenchym varlete obsahuje stočené semenotvorné kanálky, vystlané zárodečným spermatogenním epitelem, jenž je tvořen Sertoliho (podpůrnými) a Leydigovými (intersticiálními) buňkami [1]. Semenotvorné kanálky ústí do kanálků odvodných, které vstupují do hlavy nadvarlete [1].

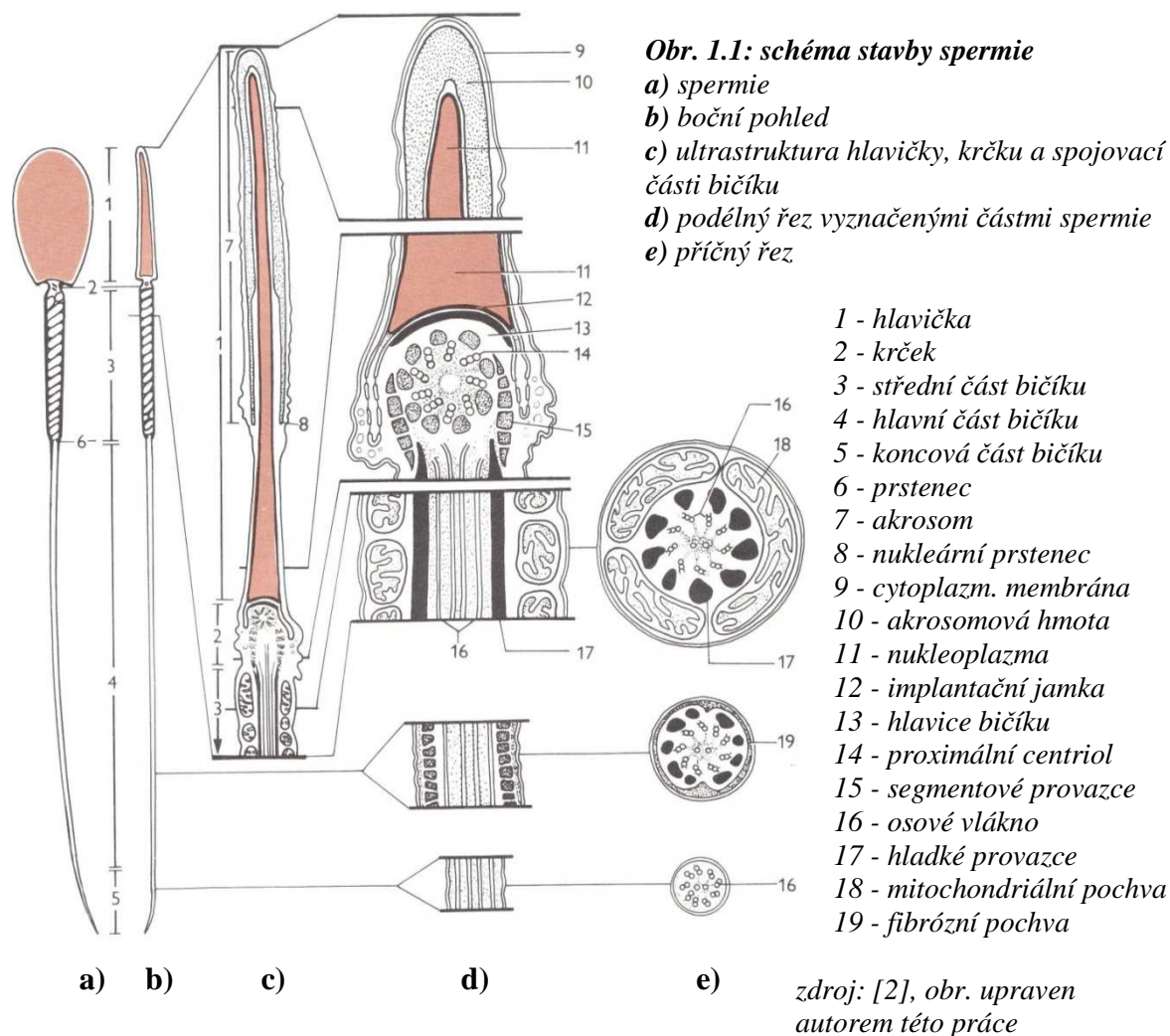
Nadvarle (*epididymis*) nasedá na varle hlavovou částí (*caput epididymis*), pokračuje v tělo nadvarlete (*corpus epididymis*) a ocas nadvarlete (*cauda epididymis*), který dále přechází v chámovod [1]. V nadvarleti spermie dozrávají a jsou zde uloženy, připravené k případné ejakulaci. Svůj fertilizační potenciál si uchovávají po dobu až dvou měsíců, k čemuž přispívají vhodné podmínky (snížená teplota, mírně kyselé pH, zvýšená koncentrace CO₂ a celkově snížený metabolismus a motilita) [1].

Chámovody (*ductus deferens*) jsou pokračováním vývodného systému z ocasů nadvarlat. Koncová část přechází v ampuli, produkující sekret, jenž se mísí se spermiemi během ejakulace [1].

Sekrety dalších přídatných pohlavních žláz představují především živné a nosné médium pro spermie a upravují prostředí močové trubice pro jejich průchod [1].

1.2 Stavba a vývoj samčí pohlavní buňky býka

1.2.1 Stavba spermie



Spermie (obr. 1.1) se skládá z hlavičky a bičíku, spojených krátkým krčkem. Plazmatickou membránu je v hlavové části možno rozdělit na akrosomální, ekvatoriální a post-akrosomální oblast, membrána bičíku se dělí na střední, hlavní a koncový oddíl [2].

Většinu objemu tvoří jádro se značně kondenzovaným chromatinem, relativně malé množství představuje cytoplazma s cytoskeletem. Akrosom je speciální membránová organela a nachází se mezi jadernou a plazmatickou membránou, kde v těsné blízkosti kopíruje špičku hlavičky [2]. Obsahuje řadu kyselých hydrolas, typických pro lysosomy a rovněž několik specifických enzymů a dalších proteinů [2]. Funkce této organely je kritická pro akrosomovou reakci (kap. 1.3.3, str. 12) [11].

Základ bičíku tvoří osově vlákno (svazek mikrotubulů), které ho protíná po celé jeho délce. V oblasti od krčku až po konec hlavní části obepínají osově vlákno hladké provazce, ve střední části ještě vrstva mitochondrií, generující ATP pro jeho velmi aktivní pohyb. Základ bičíku je připojen k jádru hlavičce (obr. 1.1, str. 9) [2].

1.2.2 Spermatogeneze

Tímto procesem vznikají hotové spermie ze zárodečných buněk zvaných spermatogonie [3]. Dělí se na spermatocytogenezi a spermiogenezi [2].

Během spermatocytogeneze se zárodečné spermatogonie mitoticky dělí za vzniku několika typů [2,3]. Výsledek tohoto kontinuálního procesu je jednak zachování konstantního stavu zárodečných buněk, jednak vznik primárního spermatocyty [2,3]. Prvním meiotickým dělením primárního spermatocyty vznikají dva sekundární spermatocyty a druhým čtyři haploidní spermatidy [2,3].

V průběhu následné spermiogeneze prodělávají dosud sférické spermatidy, vzniklé meiosou, rozsáhlé morfologické změny. Ztratí většinu své cytoplazmy, dojde ke kondenzaci nukleárního chromatinu, vytvoření akrosomové čepičky z Golgiho aparátu a k tvorbě bičíku [3]. Po odpojení od Sertoliho buněk (spermiace) se spermie přesouvají do nadvarlete [2,3].

1.2.3 Zrání spermie - epididymální maturace

V průběhu spermiogeneze dochází k nejvýraznější diferenciaci, nicméně fertilizační potenciál získává spermie až během svého epididymálního tranzitu [4]. V průběhu spermatogeneze je část diferenciaci regulována kontrolou genetické exprese gamety, v okamžiku kondenzace chromatinu během spermiogeneze se však exprese stává téměř neaktivní [4]. Další posttestikulární modifikace jsou proto považovány za důsledek interakce spermie s prostředím epididymálního lumen (popř. semenné plazmy či samičího genitálního traktu) [4].

Především jde o získání motility a schopnosti rozeznat a navázat se na zónu pellucidu (*zona pellucida* = glykoproteinový obal vajíčka) [4]. Tyto změny jsou spojeny s remodelací buněčné membrány [4] za účasti proteas a enzymů, zahrnutých

v metabolismu glykoproteinů (glykosidasy, glykosyltransferasy) [4]. Důležitou roli hrají speciální vesikulární útvary epididymosomy [4].

1.3 Interakce spermie s prostředím samičího genitálního traktu

Aby byla spermie schopna akrosomové reakce, musí prodělat kapacitaci [5]. Ke kapacitaci dochází v oviduktech, kde spermie tvoří tzv. rezervoár [5].

1.3.1 Tvorba oviduktálního rezervoáru

Nekapacitované spermie se vážou na oviduktální epitel pomocí lektin-sacharidových interakcí a tvoří zde rezervoár [5]. Navázané prodělají kapacitaci, během níž se receptory, zodpovědné za vazbu na ovidukt, ztratí a spermie se uvolní. Význam tvorby rezervoáru je zřejmě jednak zabránění polyspermie, jednak prodloužení životnosti spermií a též načasování kapacity v závislosti na ovulaci, kdy jsou uvolňovány faktory, které kapacitaci stimulují [5].

1.3.2 Kapacitace

Kapacitací získává spermie schopnost správné akrosomové reakce [5]. Některé spermie prodělají akrosomovou reakci předčasně. Tento patologický jev se nazývá spontánní akrosomová reakce a buňka již většinou není schopna fertilizace a je odsouzena k zániku [5].

Za jistých podmínek je možné kapacitovat epididymální spermie *in vitro*: vyšší koncentrace HCO_3^- , Ca^{2+} , přítomný energetický substrát a akceptor sterolů (většinou albumin), který usnadňuje cholesterolový eflux (kap. 1.5.3, str. 22) [5]. U býka je *in vitro* možné kapacitaci indukovat heparinem [6].

Kapacitace zahrnuje změny v architektuře buněčné membrány (hlavně v lipidovém složení), což vede ke zvýšené fluiditě membrány a odlišné konfiguraci membránových domén – zejména odkrytí receptorů pro vazbu na zonu pellucidu [5]. Změny společně způsobí destabilizaci membrány a vytvoří tak vhodné podmínky pro membránovou fúzi, ke

které později dochází v průběhu akrosomové reakce [5]. Kapacitaci provází zvýšení intracelulárního Ca^{2+} , pH, cAMP a HCO_3^- , což vyústí ve fosforylační kaskády a indukci hyperaktivace, která souvisí se zvýšenou rychlostí a sníženou linearitou pohybu [5].

1.3.3 Akrosomová reakce a fúze gamet

Mechanismus navigace spermie k vajíčku po uvolnění z rezervoáru není zcela jasný. Chemotaxe je uplatňována spíše v bezprostřední blízkosti vajíčka [7]. Na větší vzdálenost by mohla být spermie naváděna termotakticky, neboť rozdíl teplot mezi místem, kde spermie tvoří rezervoár a místem, kde dochází ke kontaktu gamet, je poměrně velký [8].

Při ovulaci vstupuje vajíčko do ampuly oviduktu v komplexu s kumulárními buňkami (*cumulus oophorus*) a extracelulárního matrix z polymerní hyaluronové kyseliny [9]. Je obaleno glykoproteinovou vrstvou (*zona pellucida*), tvořenou glykoproteiny bZP1, bZP2, bZP3 α , bZP3 β a bZP4 [10]. Pouze kapacitované spermie mohou proniknout *cumulus oophorus* [11]. Zdá se, že hyaluronidasa, jedna z hydrolas na povrchu spermie, zde hraje spíše druhořadou roli, a že spermie pronikne *cumulus oophorus* skrz kanálky, které vyplývají z jeho radiálního uspořádání [11]. Navigace je zřejmě řízena chemotaxí, která se objevuje až po kapacitaci [11].

Interakce receptoru na povrchu spermie a zony pellucidy zahájí akrosomovou reakci [11,12]. Ta zahrnuje rapidní influx Ca^{2+} , fúzi akrosomové a plazmatické membrány spermie a následné vylití obsahu akrosomu do extracelulárního prostoru zony pellucidy [11,12]. Akrosom obsahuje kyselé hydrolasy; nejvýznamnější z nich je akrosin, který se nachází též na povrchu spermie a jako receptor se váže na zonu pellucidu [11]. Akrosin štěpí autokatalyticky proakrosin na enzymaticky aktivní α -akrosin a dále na β -akrosin, který se již neváže, je však stále enzymaticky aktivní [11]. Akrosin (v obou formách) je serinová proteasa podobná trypsinu [11].

Nakonec spermie vytvoří otvor, kterým propluje dovnitř. K penetraci zřejmě též přispívá vrtulovitý pohyb spermie po hyperaktivaci [11]. Další události zahrnují adhezi spermie a fúzi membrán obou gamet. Následuje aktivace vajíčka, která je spojena se zvýšením intracelulární hladiny Ca^{2+} během několika sekund až minut po fúzi [12], s pravidelnými oscilacemi po dobu několika hodin, dokud nedojde k první mitóze [12]. Zbylé spermie jsou fagocytovány [11].

1.4 Býčí semenná plazma

Objem ejakulátu býka je obvykle asi 4 ml a obsahuje okolo 10^9 spermií / ml [1]. Většinu objemu tvoří semenná plazma (cca 95%) [2]. Je to produkt přídatných pohlavních žláz, převážně semenných vaků [1,2].

Semenná plazma je především nosič [1,2], prostřednictvím něhož jsou spermie dopraveny do samičího traktu. Obsahuje také látky, které představují jednak důležité metabolity a zdroje energie, jednak udržují pH (6,2 – 7,8) [1] a osmotickou rovnováhu [1].

Dále obsahuje dekapacitační faktory, které při ejakulaci interagují s povrchem spermie a ke kapacitaci může dojít až po odstranění nebo modifikaci těchto faktorů v samičím genitálním traktu. Tento efekt přispívá ke správnému načasování kapacity a její indukci interakcí s faktory v samičím prostředí a bude podrobněji popsán v kap. 1.5.3. na str. 22.

1.4.1 Nízkomolekulární složky býčí semenné plazmy

V semenné plazmě jsou přítomny četné nízkomolekulární látky (aminokyseliny, nukleotidy, sacharidy, lipidy, anorganické ionty, organické kyseliny, vitamíny atd.) [1]. Velmi výrazný je vysoký obsah fruktosy a citrátu [1]. O případné participaci fruktosy na fertilizaci jako modulátoru heparin vazebné aktivity BSP proteinů bude zmínka v kap. 1.5.2.2 (str. 20); je však hlavně zdrojem energie pro spermie (fruktolýza) [1,2]. Na výživě se podílejí i další cukry, aminokyseliny, lipidy atd. Citrát společně s HCO_3^- (a dalšími látkami) udržují pH rovnováhu [1]. Ve vysokých koncentracích se v semenné plazmě nacházejí též inositol a glycerylfosforylcholin, které společně s fruktosou udržují osmotickou rovnováhu [1].

1.4.2 Proteiny býčí semenné plazmy

V semenné plazmě bylo nalezeno okolo 250 proteinových stop [13], 99 jich bylo identifikováno [14]. Majoritní proteinovou frakci představují BSP proteiny (BSP-A1/-A2, BSP-A3 a BSP-30-kDa), které byly velmi detailně studovány a charakterizovány a podrobně budou popsány v kap. 1.5 (str. 15).

Některé další proteiny byly studovány. Spermadhesin aSFP (z angl. acidic Seminal Fluid Protein) je 13 kDa kyselý protein o 114 AK sekretovaný semennými vaky a ampulou chámovodu v relativně vysokých koncentracích (1 – 7 mg/ml) [15]. Byla popsána jeho antioxidační aktivita [16] a možná participace na inhibici akrosinu [17]. Spermadhesin Z13 je 116 AK neglykosylovaný protein s M_r 13 000, který existuje ve formě kovalentního dimeru, je ze 40 % identický k aSFP a stejně tak nevykazuje heparin-vazebnou aktivitu [18]. Osteopontin (OPN) je kyselý protein, produkován semennými vaky a ampulou, který existuje v semenné plazmě ve dvou isoformách 14 a 55 kDa [19]. OPN se zřejmě účastní kontaktu spermie s vajíčkem interakcí s integriny a/nebo multimerizací; je rovněž sekretován buňkami ovidukálního epitelu [19]. Seminalplasmin je 47 AK silně bazický peptid s výrazně antimikrobiálními účinky, který je v semenné plazmě v koncentraci cca 0,5 mg/ml. Antimikrobiální efekt spočívá v penetraci buněčnou membránou a inhibici RNA polymerasy (s preferencí pro inhibici syntézy rRNA) a reversní transkriptasy [20].

Ačkoliv nebyla prokázána signifikantní korelace mezi celkovou hladinou proteinů a fertilitou [21], některé proteiny se zdají být potenciálními markery lepší či horší plodnosti, alespoň u plemen, které byly zkoumány (Holštýn, Nelore) [21-25]. U fertilnějších býků byla zjištěna nižší exprese Z13 a vyšší exprese 58 kDa PLA₂ (fosfolipasa A₂) isoformy a 55 kDa osteopontinu [22]. Další proteiny v pozitivní korelaci s fertilitou jsou prostaglandin D synthasa (PGDS) v semenné plazmě [23] a aSFP, jež se nacházel v 8,5x vyšším množství v asociaci s membránou spermie u býků s lepší fertilitou [24]. V tekutině *cauda epididymis* (CEF – z angl. Cauda Epididymal Fluid) byla α -L-fukosidasa 2 a kathepsin D v 2,3x, resp. 2,4x vyšší koncentraci u fertilnějších býků. Některé proteiny byly identifikovány též jako potenciální negativní markery: BSP-30-kDa s vyšší expresí u méně fertilních býků [22], BSP-A3 asociovaný s membránou spermie (2,5x více u méně fertilních býků) [24] nebo tři 24-27 kDa isoformy PGDS (pI 6,3 - 5,8) v CEF [25]. To může být v rozporu s výsledky uvedenými v [23] (PGDS jako marker vyšší fertility), nicméně v semenné plazmě to byla jediná isoforma (26 kDa pI 6,2), a to v 8,5x nižší koncentraci než v CEF [23].

1.5 BSP proteiny

Jedná se o čtyři majoritní proteiny býčí semenné plazmy: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 a BSP-30-kDa. Zkratka BSP znamená býčí semenná plazma (z angl. Bovine Seminal Plasma), označení písmenem A (z angl. Acidic) vyjadřuje jejich kyselý charakter (pI v rozmezí 3,9 – 5,2 [26]) a 30-kDa v případě posledního člena vyjadřuje přibližnou molekulovou hmotnost [27]. BSP-A1 a A2 jsou různé glykoformy téhož proteinu [28] a jejich směs bývá označována též BSP-A1/-A2 [28], nebo PDC-109 – název odvozený od N- a C- koncových aminokyselin (Asp - D, resp. Cys - C) a délky polypeptidového řetězce (109 aminokyselin), P jako peptid/protein [29].

Mezidruhová existence proteinů homologních k BSP je relativně dlouho známa [30, 31]. Jelikož bylo nedávno objeveno mnoho dalších genů BSP superrodiny [32] a ještě mohou přibývat, byl navržen nový jednotný způsob názvosloví proteinů BSP [33]. BSP má nově znamenat Binder of Sperm (vázající spermii) a proteiny/geny se zařadí do jedné ze tří skupin: BSP, BSPH (z angl. Homologous) nebo BSPL (z angl. Like). Podle tohoto názvosloví se PDC-109, BSP-A3 a BSP-30-kDa mění na BSP1, BSP3 a BSP5 [33]. V této práci však budu používat poněkud zažitější původní označení a názvem BSP budou myšleny čtyři majoritní proteiny býčí semenné plazmy (tato kapitola), resp. kompletní proteiny býčí semenné plazmy v kap. 2-5.

BSP jsou sekretovány přídatnými pohlavními žlázami, konkrétně semennými vaky a ampulou chámovodu [31,34] ve vysoké koncentraci 31,4 – 47 mg/ml, což odpovídá až 57 % veškerých proteinů býčí semenné plazmy [35]. Z toho PDC-109 tvoří většinu a přibližný poměr PDC-109 : BSP-A3 : BSP-30-kDa je 10 : 1 : 1 [35]. Během ejakulace se vážou na celou membránu spermie [36] s jistou preferencí pro střední část a akrosomální oblast [34]. BSP-30-kDa byl detekován v malé míře i na epididymálních spermích [34], nicméně testikulární ani epididymální exprese mRNA pro BSP-30-kDa ani žádný jiný BSP detekována nebyla [31]. Počet navázaných BSP na membráně ejakulované spermie byl stanoven na zhruba 9 mil. molekul proteinu na jednu buňku [34], což odpovídá cca 4 - 6 % celkových buněčných proteinů [35].

1.5.1 Struktura BSP proteinů

Primární struktura BSP proteinů byla objasněna, včetně posttranslačních modifikací [29,34,37-39].

PDC-109 je protein o 109 AK, který obsahuje dvě fibronectinové domény typu II (Fn2A: Cys24 – Cys61; Fn2B: Cys69 – Cys109) a dva intramolekulární disulfidické můstky [29,40]. Je to směs dvou glykoform: glykosylovaného BSP-A1 (majoritní) a neglykosylovaného BSP-A2 [34]. Trisacharid, navázaný O- glykosidickou vazbou na Thr11, má strukturu [34,38]:



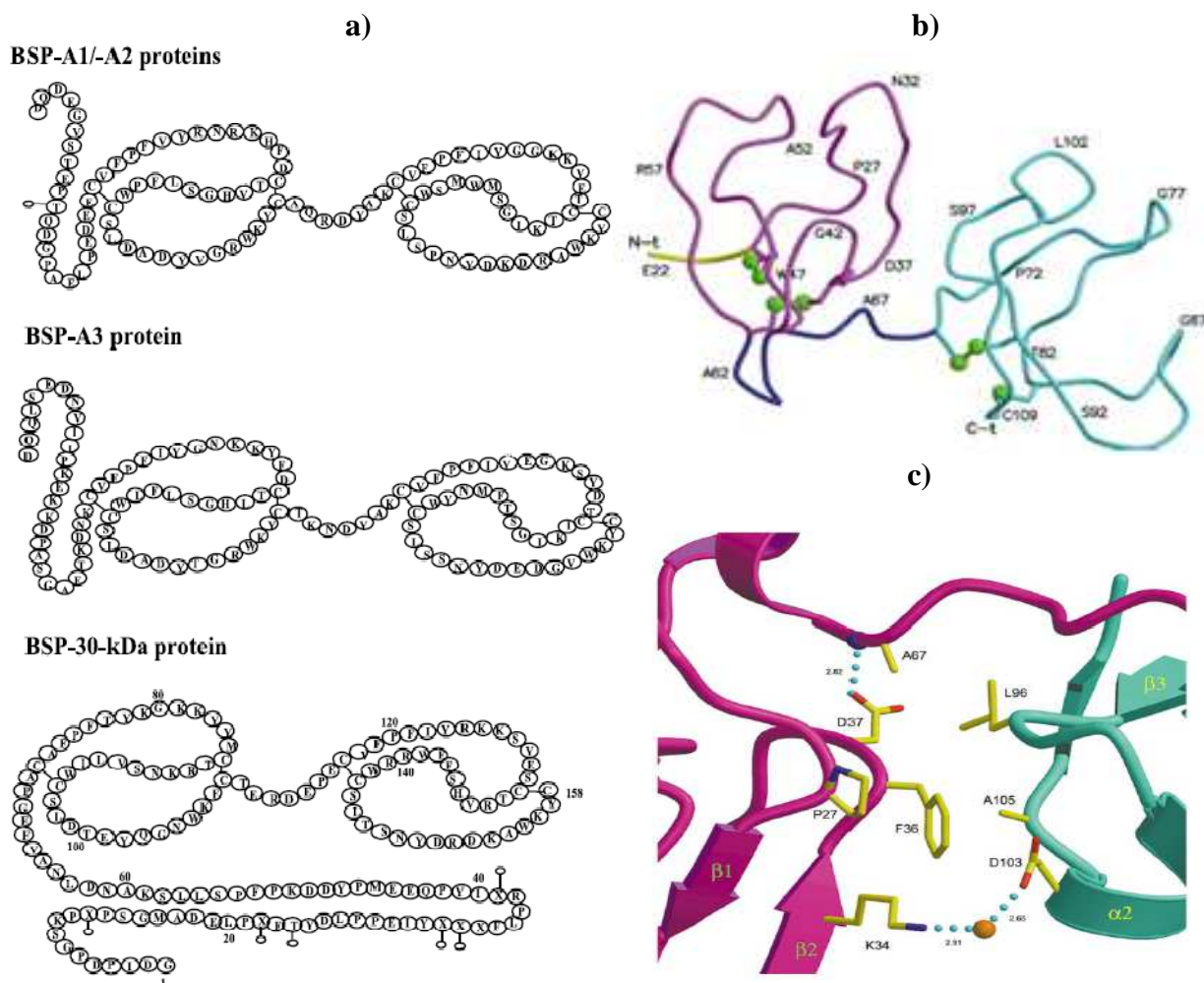
(NeuNAc = kyselina N-acetylneuraminová, Gal = galaktosa, GalNAc = N-acetyl-2-galaktosamin)

Relativní molekulová hmotnost PDC-109 byla zjištěna $13443,4 \pm 0,5$, resp. $12788,4 \pm 0,6$ pro neglykosylovanou formu [34].

BSP-A3 je 115 AK protein o relativní molekulové hmotnosti 13403 a obsahuje rovněž dvě domény typu Fn2 (Fn2A: 28 - 66; Fn2B: 73 - 115) [37]. Vykazuje asi 70% homologii s PDC-109 [37] ale není glykosylován [28]. BSP-30-kDa se skládá ze 158 AK, M_r se pohybuje mezi 25800 – 26400 v závislosti na glykosylaci [39]. Se svými šesti O- glykosidicky vázanými sacharidy (Thr11, 21, 32, 33, 34 a 39) je nejvíce glykosylovaný BSP protein (M_r sacharidové komponenty vychází na 7200 – 7800) [39]. Na rozdíl od C- konce, kde jsou dvě Fn2 domény, podobně jako u ostatních BSP, N- konec s oblastí bohatou na prolin je poněkud delší a sekvenčně unikátní [39].

Na obr. 1.2a (str. 17) jsou znázorněny primární struktury BSP proteinů s vyznačenými doménami. Každý z proteinů BSP splňuje následující schéma [33]:

variabilní N-konec – Fn2A – linker – Fn2B



Obr. 1.2: *a)* Schematická struktura BSP proteinů; jsou vyznačeny disulfidické můstky a místa glykosylace na N-koncových doménách *b)* 3d model struktury PDC-109; barevně jsou odlišeny jednotlivé domény, zeleně jsou vyznačeny disulfidické můstky *c)* model detailu interakce na rozhraní obou domén; oranžově je označena molekula solventu (zdroj: *a* – [41]; *b*, *c* – [42])

Studie krystalu PDC-109 [42] ukázala, že obsahuje 2 globulární domény spojené krátkou sekvencí o sedmi AK (obr. 1.2b). Tyto domény jsou k sobě vázány hydrofobními interakcemi mezi aminokyselinami uvnitř dutiny na rozhraní obou domén a interakcí mezi asparagovou kyselinou a lysinem na povrchu prostřednictvím molekuly solventu vodíkovými můstky (obr. 1.2c) [42].

Vypočtený povrchový potenciál PDC-109 a BSP-30-kDa je převážně pozitivní, u BSP-A3 naopak negativní [43].

1.5.2 Vazebné vlastnosti BSP proteinů

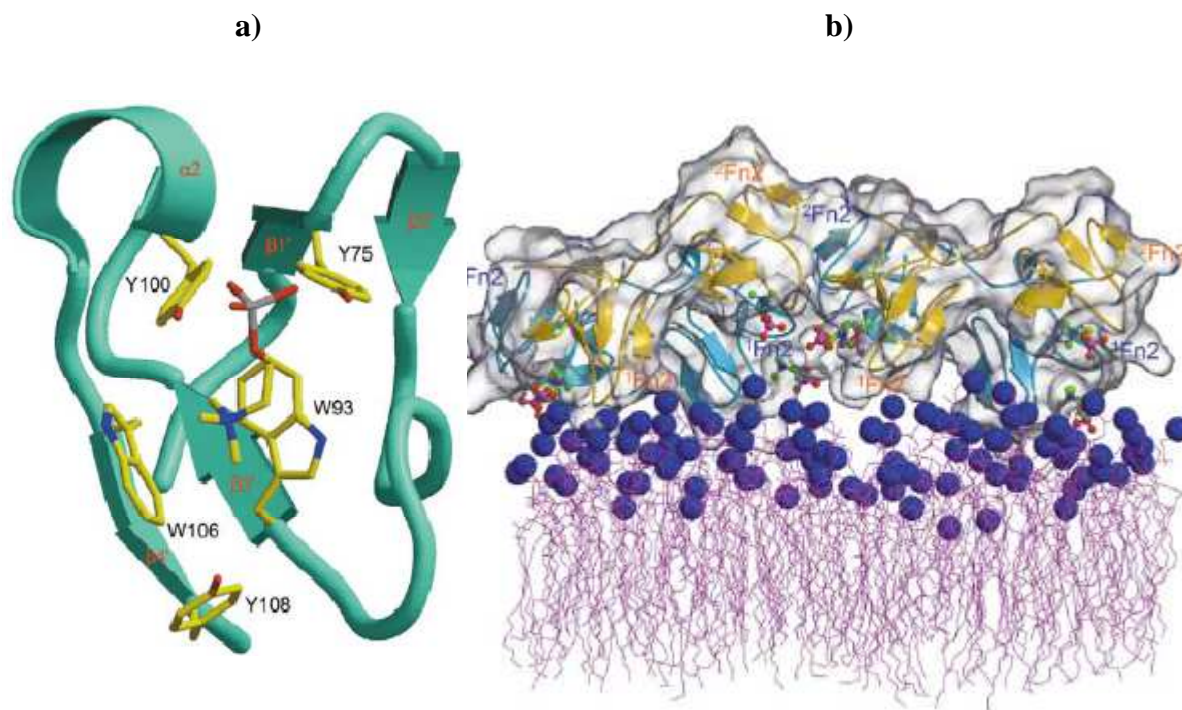
Zdá se, že BSP jsou multifunkční a multivazebné proteiny, interagující s vysoko- i nízkomolekulárními látkami: s kolagenem a želatinou (denaturovaný kolagen) [27,40], heparinem a jinými glykosaminoglykany [44,45], apolipoproteinem A-I (ApoA-I) a HDL (z angl. High Density Lipoprotein) [46], D-fruktosou [47], L-fukosou a fukosylovanými ligandy [48], Mannanem a D-mannosou [49], fosfocholinovou strukturou (tj. fosforylcholin, fosfatidylcholin, fosfocholinové lipidy), neopentyl. skupinami alkyl-Superosy [40], diethylaminoethylovými skupinami DEAE-Sephadexu [84] aj. V neposlední řadě asociují za vzniku oligomerů a vysokomolekulárních agregátů [28,50].

1.5.2.1 Interakce s lipidy:

BSP interagují s fosfolipidy s výraznou specifitou pro cholinový typ [51]. Velmi silně vážou fosfatidylcholin (PC), sfingomyelin (SM). Interagují také s lyso-PC, PC plazmalogenem a PAF (Platelet Activating Factor) [51]. S jinými než cholinovými fosfolipidy, jako je fosfatidyletanolamin (PE), fosfatidylserin (PS), fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylinositol (PI) aj., neinteragují [51] s výjimkou BSP-30-kDa, který vykazuje jistou afinitu pro některé z těchto lipidů (PE, PS, PI) [51].

Interakce je rychlá [52,53] a Ca^{2+} independentní [51]. Je favorizována entropickým příspěvkem a velice nízkou disociační konstantou [53]. Krystalografické studie v kombinaci s molekulárně dynamickými počítačovými simulacemi odhalily interakční mechanismus komplexu PDC-109 s fosforylcholinem [42,54]. Vazba je realizována π -kation interakcí mezi kvartérní cholinovou skupinou a indolovým kruhem tryptofanu a je podpořena interakcí -OH skupin tyrosinů a fosfátové skupiny fosforylcholinu (obr. 1.3a na str. 19) [42]. Interakce pravděpodobně neustále náhodně vzniká a zaniká [54]. Na každé doméně se nachází jedno vazebné místo pro fosforylcholin; tato vazebná místa jsou orientována na stejnou stranu proteinu [42]. Navíc po navázání fosforylcholinu dojde ke změně konformace [42,54] a formaci dimerů (polární i hydrofobní interakce). Vzájemná orientace domén pak přinutí další fosforylcholin-vazebné místo k interakci s případným lipidem v membráně [54]. Čtyři vazebná místa jsou potom na stejné straně dimeru orientována v jeho rozích – to je v souladu s výsledky biofyzikálních experimentů, že se

PDC-109 preferenčně váže na cholin-lipid bohaté domény, obsahující 12-15 lipidů na molekulu proteinu [42,52,55]. Na obr. 1.3b je znázorněn model navázaného dimeru PDC-109 na membránu.



Obr. 1.3: **a)** Model vazebného místa pro fosforylcholin: π -kation interakce mezi kvartérní cholinovou skupinou a indolovými kruhy tryptofanových residuí a interakce hydroxylových skupin tyrosinů a fosfátové skupiny fosforylcholinu prostřednictvím vodíkových můstků **b)** 3d model dimeru PDC-109 v interakci s vnější lipidovou vrstvou membrány, červenofialově jsou vyznačeny fosfátové skupiny fosforylcholinu, představující vazebná místa pro fosfocholinové hlavičky lipidů (zdroj: [42])

Interakce PDC-109 s lyso-PC je asi 250x silnější než s fosforylcholinem, s diacyl-PC ještě asi o 3 řády silnější než s lyso-PC, což implikuje, že zatímco pro specifitu interakce je klíčová cholinová skupina [51], pro sílu vazby je důležitá i hydrofobní část lipidu [56]. Toto je konzistentní s pozorováním, že PDC-109 redukuje pohyblivost i acylových řetězců až do pozice C14 při použití dimyristoylfosfatidylcholinových (DMPC) vesikul [55].

Vazba na membránu zároveň redukuje pohyblivost především PC lipidů, méně PE a cholesterolu – asi spíš přes imobilizaci PC než přímou interakcí [57]. Fluidita membrány a zvýšená teplota tento efekt zvyšují [57,58].

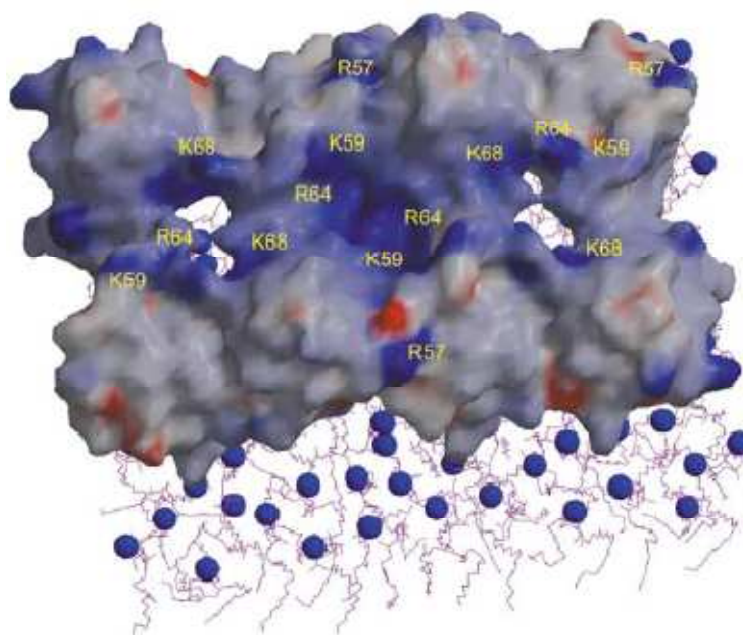
Bylo zjištěno, že vazba stimuluje mírný cholesterolový a fosfolipidový eflux, po kterém se v médiu nacházely částice hustotou srovnatelné s HDL, obsahující komplexy

BSP-fosfolipidy-cholesterol [59,60]. K procesu extrakce fosfolipidů dochází hlavně z vnější vrstvy membrány, preferenčně s lipidy s nenasycenými nebo krátkými MK [61]. V malé míře i z vnitřní vrstvy membrány, tento proces je však mnohem pomalejší a je zřejmě umožněn díky pomalé translokaci lipidů pasivní difúzí do vnější vrstvy [61]. Přítomnost cholesterolu a PE extrakci brzdí, při čistém PC/SM je efekt značný [62].

Mechanismus efluxu není jasný, je možné, že je v něm zahrnuta agregace proteinu [59] a je též možné, že je různý pro cholesterolový a fosfolipidový eflux: cholesterolový eflux měl rapidní počátek a dosáhl maxima mnohem dříve než fosfolipidový eflux, jehož křivka rostla pozvolna po celou dobu inkubace [60]. Rovněž nebyla prokázána žádná přímá interakce PDC-109 s cholesterolem [51,63], ovšem v přítomnosti PC jsou generovány zmíněné komplexy [63]. Navíc byly nedávno v sekvenci PDC-109 identifikovány CRAC domény (z angl. Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus) v blízkosti Trp residuí, účastnících se vazby s fosfocholinovou strukturou [64], a také redukce pohyblivosti cholesterolových analogů se zvyšovala se strukturní podobností analogu s cholesterolem, což implikuje specifickou přímou interakci [65]. Samotná doména Fn2B (PDC-109/b) není schopna stimulovat cholesterolový eflux [65], ačkoliv se na fosfocholinové lipidy váže – zdá se, že však nepenetruje do membrány tak hluboko, jako nativní PDC-109 [65].

1.5.2.2 Interakce s heparinem a jinými GAG:

Je známo, že BSP proteiny vážou heparin [44]. Byly identifikovány některé bazické aminokyseliny v PDC-109 (Arg, Lys), které jsou v interakci patrně zahrnuty [66]. Dále, tyto heparin vazebná místa jsou orientovaná na opačné straně proteinu, než jakou se váže na membránu [42]. Na obrázku 1.4 (str. 21) jsou označeny aminokyseliny, které se této interakce účastní. Jsou to oddělené kationické klastry, vzdálené od sebe 20-30 Å; mají podobnou topologii jako vazebná místa jiných GAG vázajících proteinů [42]. Vazba se zdá být závislá na polypeptidovém řetězci - pouze nativní protein zůstal navázán při proteolytických pokusech [66].



Obr. 1.4: Model navázaného oligomeru PDC-109 na cholin fosfolipidovou membránu, barevně je vyznačen elektrostatický povrchový potenciál proteinu. Popsány jsou aminokyseliny, zahrnuté v interakci s heparinem. (zdroj: [42])

Rozdělení kompletních proteinů semenné plazmy na heparinové afinitní chromatografii ukazuje, že v obou frakcích (heparin vázající – H^+ a nevazající – H^-) se nacházejí stejné BSP proteiny, ačkoliv v rozdílných agregačních stavech [67]. Podobný jev byl pozorován i u HSP-1, homologního hřebčího seminálního proteinu [30]. H^+ forma tohoto proteinu existovala v agregované formě a lišila se od nevazebné formy glykosylací [30]. Na rozdíl od hřebce, v heparin nevazající frakci jsou obě glykoformy PDC-109 ve formě agregátů, zatímco heparin vázající frakce vykazuje polydisperzitu v rozmezí M_r 10000 - 60000 [30,67]. Byl navržen hypotetický mechanismus regulace vazby agregací, podmíněnou glykosylací [28,30]. Ten však nebyl potvrzen, neboť enzymatickou deglykosylací PDC-109 se polydisperzní povaha proteinu nezměnila [50]. Agregace v interakci však zahrnuta zřejmě je, neboť při afinitní chromatografii na heparinovém sloupci docházelo k eluci proteinů za takových různých podmínek, při kterých současně dochází k disociaci proteinu, tj. vysoká iontová síla, teplota nad 36 °C, přítomnost fosforylcholinu nebo 2% D-fruktosy [50,66,67] – nicméně pouze heparin vázající frakce byla tímto sacharidem ovlivněna [67].

Byla popsána interakce BSP i s jinými glykosaminoglykany (GAG): chondroitin sulfát, dextran sulfát, fukoidan, hyaluronová kyselina [45]. Specifita BSP k různým GAG může být ovlivněna rozdílnou orientací sulfátových skupin [45].

1.5.3 Biologická funkce BSP proteinů

Proteiny semenné plazmy, především BSP, participují při několika klíčových krocích fertilizace. Významně modulují proces tvorby oviduktálního rezervoáru, kapacitaci a akrosomovou reakci. Mají stimulační efekt na sekreci LH a FSH po přidání k médiu buněčné kultury adenohypofýzy [68]. Pokud se koinkubují společně s GnRH, dochází při nízké koncentraci k inhibici sekrece, při vyšší ke stimulaci; byly proto označovány jako „gonadotropin release stimulatory and inhibitory proteins“ [68].

1.5.3.1 Vazba na membránu spermie a lipidový eflux

Při kontaktu epididymálních spermií se sekrety přídatných pohlavních žláz během ejakulace se BSP proteiny naváží na membránu spermie, kterou zcela pokryjí [36,55]. Vážou se přednostně na fosfocholinové lipidy [51], které představují 60 – 70 % membránových lipidů spermie [69]. Jelikož přítomnost cholesterolu inhibuje lipidový eflux [62], zpočátku BSP membránu stabilizují tím, že imobilizují některé lipidy [57] a brání tak předčasné kapacitaci. Později však postupnou extrakcí cholesterolu, která je rychlejší než extrakce fosfolipidů [60], dochází ke snížení poměru cholesterol/fosfolipidy, což membránu dále destabilizuje [60]. Je zajímavé, že v případě BSP-A3 byl fosfolipidový eflux slabší než u ostatních BSP [60], ale cholesterolový eflux i kapacitace stimulovaly BSP přibližně ve stejném rozsahu [59]. To by mohlo znamenat, že cholesterolový eflux, nikoliv fosfolipidový, je klíčový v procesu kapacitace (samotný BSP-A3, stejně jako ostatní BSP, po delší inkubaci s epididymálními spermii stimuluje lipidový eflux a kapacitaci) [59,60].

1.5.3.2 Tvorba oviduktálního rezervoáru

PDC-109 a ostatní BSP proteiny hrají též klíčovou roli v procesu tvorby oviduktálního rezervoáru. Právě BSP jsou zodpovědné za vazbu spermie na fukosylové komponenty povrchu oviduktálního epitelu [43,48,70]. Tyto komponenty byly identifikovány jako annexiny (ANXA 1, 2, 4 a 5) [71]. Po kapacitaci schopnost vazby ztrácejí – zda v důsledku modifikace či ztráty BSP, není známo [48]. Množství BSP proteinů, navázaných na

membránu po kapacitaci *in vitro*, bylo však jen nepatrně sníženo oproti nekapacitované spermii [34]. Po reinkubaci kapacitovaných spermií s BSP byla vazebná schopnost obnovena [43,48,70]. Navíc spermie inkubované s heparinem, ale s inhibicí kapacity, tuto schopnost neztrácejí, což dále ukazuje, že za přerušení vazby je zodpovědná právě modifikace či ztráta BSP [48].

1.5.3.3 Indukce kapacity

Je známo, že Heparin, HDL (z lidského séra) a BSA mají schopnost indukovat kapacitu *in vitro* [6,60,72]. Samotné BSP proteiny jsou také schopny *in vitro* stimulovat cholesterolový/fosfolipidový eflux [59,60], ovšem kapacitu indukují až po relativně dlouhé inkubaci (6 – 8 hod), což neodpovídá fyziologickým podmínkám [59]. Nicméně ejakulované spermie, nebo krátce preinkubované epididymální spermie s BSP (20 min), jsou schopny výrazně urychlit kapacitu indukovanou HDL či heparinem [72,73].

HDL a albumin fungují jako akceptor cholesterolu [60,72], čímž usnadňují cholesterolový eflux a destabilizují tak membránu. To je zřejmě nezbytným předpokladem akrosomové reakce. Jelikož BSP vážou ApoA-I a komplex ApoA-I/HDL (ApoA-I je hlavní komponentou HDL) [46], zdá se, že tak usnadňují přesun membránového cholesterolu na tyto akceptory sterolů [46]. Přítomnost ApoA-I je zřejmě kritická [72]. Ve folikulárních tekutinách krávy (FF) byl nalezen jediný zástupce lipoproteinů - FF-HDL (z angl. Folicular Fluid HDL) [74]. Ten je sám o sobě schopen indukovat kapacitu a podobně jako v případě HDL, preinkubací s BSP dochází k akceleraci tohoto procesu [74]. Dokonce je efektivnější než HDL z lidského séra [75].

BSA je sice schopen indukce, nicméně spíše v experimentálních podmínkách, kde jeho koncentrace značně převyšovala fyziologické hodnoty ovidukálního albuminu (OFA = Oviductal Fluid Albumin) – zatímco FF-HDL byl prokázán jako hlavní akceptor sterolů [75,60].

Mechanismus indukce kapacity heparinem je patrně odlišný [72,76]. Interakcí heparinu s membránou spermie dojde k intracelulární elevaci hladiny Ca^{2+} a nárůstu pH, což je signálem ke kapacitaci [77]. Přítomnost glukosy v kapacitačním mediu *in vitro* působí inhibičně – glykolýzou generovaný laktát totiž snižuje pH [77]. Fruktosa, přítomná v semenné plazmě ve vysokých koncentracích [1], působí také inhibičně, je však

dostatečně zředěna v samičím pohlavním ústrojí [77]. BSP proteiny stimulují efekt heparinu podobně jako v případě HDL, vytvořením vazebných míst pro heparin [72,78].

FF, pokud neobs. FF-HDL, indukují kapacitaci pouze po preinkubaci s BSP, pravděpodobně interakcí s heparinu podobnými glykosaminoglykany, které jsou zde přítomny [74,79]. Folikulární tekutiny krávy obsahují dva glykosaminoglykany (FF-GAG): heparan sulfát a chondroitin sulfát B [79]. Silně interagují s BSP proteiny a rovněž indukují kapacitaci, přičemž rozhodující efekt má heparan sulfát [80].

1.5.3.4 Další funkce BSP

BSP proteiny mají inhibiční efekt na fosfolipasu A₂ (PLA₂) z lidského séra [80]. Seminální PLA₂, která produkcí fúzogenních lysolipidů hraje klíčovou roli při modifikacích membrány v průběhu fertilizace, je kolokalizována s BSP na povrchu buňky [80]. Při použití PC lipidů jako substrátu byla inhibice nejvýraznější [80]. Není jasné, zda je efekt způsoben vazbou lipidů na BSP a tím jejich protekcí, nebo přímou interakcí BSP s PLA₂, ovšem fakt, že při použití prasečí pankreatické PLA₂ byla preferenčně inhibována hydrolýza PE lipidů [80], se kterými BSP příliš neinteragují [51], hovoří spíše pro přímou interakci [80]; nicméně oba mechanismy mohou být zahrnuty. Po odsunu BSP se téměř nedetekovatelná aktivita enzymu zvýšila více než 100x [80]. Mohla by to být další regulační funkce BSP v procesu fertilizace, v souvislosti s jejich odsunem v pozdějších fázích pobytu spermie v samičím genitálním traktu [80].

Dále bylo zjištěno, že PDC-109 má stimulační účinek na Ca²⁺-ATPasu – enzym kritický pro kontrolu hladiny vápníku a spojovaný s motilitou [81]. Vazba PDC-109 motilitu zvyšuje, pravděpodobně stimulací Ca²⁺-ATPasy. Efekt se přestal projevovat při 41 °C nebo při pH pod 6,5 a nad 8,5 [81]. Tyto podmínky by mohly souviset se změnou agregačního stavu [81].

Vazba spermie a proteinů semenné plazmy ke glykoproteinům zony pellucidy (ZP) byla inhibována mannanem a D-mannosou [49]. Proteiny semenné plazmy vázající ZP-glykoproteiny rovněž vázaly mannan a mannosu a zdá se, že vazebná místa pro mannosu jsou zahrnuta v interakci spermie se ZP [49]. Byla vyslovena hypotéza, že nekapacitované spermie obsahují vazebná místa pro fukosu a po kapacitaci dojde k remodelaci membrány a/nebo odsunu semenné plazmy, kdy tato místa zaniknou a spermie se uvolní z ovidukálního epitelu. Zároveň se odkryjí vazebná místa pro

mannosu, která spermii umožní vázat se na zonu pellucidu [82]. Mezi proteiny hlavní mannan vázající frakce byl identifikován PDC-109 [49].

BSP jsou tedy multifunkční proteiny, hrající *in vivo* podstatnou úlohu ve fertilizaci. Působí zároveň jako dekapacitační faktor tím, že stabilizují membránu a zabraňují tak předčasné kapacitaci, zároveň pak vazbou na oviduktální epitel a interakcí s faktory, přítomnými v oviduktálních a folikulárních tekutinách (FF-GAGs, FF-HDL, OFA) kapacitaci indukují. Dále zřejmě zasahují do regulace motility a mohou se účastnit i pozdějších fází, vedoucích k akrosomové reakci (inhibice PLA₂, interakce se ZP).

Po delší inkubaci spermií *in vitro* s proteiny semenné plazmy mají BSP škodlivý efekt (rozrušení membrány) – to však není fyziologicky relevantní. Pro uchovávání spermií se proto používá vaječný žloutek [83], který obsahuje lipidovou frakci, jež BSP proteiny zcela vyváže [83], navíc inkorporuje jisté lipidy do membrány spermie, čímž jí ještě dále stabilizuje [83].

Ve všech ohledech se zdá, že BSP proteiny působí spíše synergicky než aditivně a důvod sekrece čtyř podobných proteinů není zcela zřejmý [39,43]. Ačkoliv vazebná místa na Fn2 doménách jsou vysoce konzervovaná mezi BSP proteiny [29,34,37], některými parametry se liší: N-terminálními doménami [29,34,37], glykosylací [28,34,38,39], povrchovými potenciály [43], kyselostí (BSP-30kDa má výrazně nižší pI – 3,9 – 4,6) [26], schopností vyvolat lipidový eflux [60], vazebnými vlastnostmi (např. trochu rozdílná lipidová specifita BSP-30-kDa [51]), agregačními stavy [28].

Je možné, že tyto drobné rozdíly zvyšují adaptabilitu spermie na variabilní podmínky v genitálním traktu různých samic [43]. Je též možné, že každý z těchto proteinů hraje individuální roli – např. vysoké hodnoty BSP-30-kDa v semenné plazmě [22] a vysoký obsah BSP-A3 v membráně spermie [24] byly v záporné korelaci s fertilitou. Nicméně většina experimentálních výsledků *in vitro* (lipidový eflux, indukce kapacity, interakce s oviduktálním epitelem) tuto domněnku nepotvrzují [43,46,59,60,70-72].

1.5.4 Agregace BSP proteinů

Za fyziologických podmínek existují BSP proteiny v agregovaných formách, za tuto tendenci je pravděpodobně zodpovědný PDC-109 [28]. Zatímco BSP-A3 byl na gelové chromatografii eluován vždy ve frakci odpovídající molekulové hmotnosti okolo 20 kDa, BSP-A1/-A2 byl eluován v agregátech 60 – 120 kDa [28]. Vysoká iontová síla, přítomnost fosforylcholinu a EDTA způsobují disociaci, zvláště pak jejich kombinace [50]. Rovněž při pH 3 nebo v 8M močovíně protein neagreguje [28]. Přítomnost D-fruktosy posouvala rovnováhu směrem k nižším M_r , tento efekt sílil s délkou inkubace [67]. Disociace je doprovázena lehce zvýšeným obsahem otáček na úkor neuspořádané struktury společně se zpřístupněním peptidických vazeb solventu a změnou v okolí Trp a Tyr residuí [50]. Předpoklad, že glykosylace může hrát v tomto procesu roli [28] však nebyl potvrzen, neboť i po enzymatické deglykosylaci protein vykazoval stále stejnou polydisperzitu [50]. Při teplotách nad 36°C a 55°C byly pozorovány strukturní přechody. V prvním případě to může souviset se změnou rovnováhy oligomer/monomer [50], v druhém případě se pravděpodobně jedná o částečnou denaturaci [50].

1.6 Cíl práce

Fertilizace je komplexní proces, jehož správný průběh je nezbytným předpokladem pro úspěšnou reprodukci vyšších organismů. Detailní studium mechanismů tohoto procesu přináší nejenom zajímavé výsledky po stránce teoretické, ale především má praktický přínos, např. v rámci řešení problémů neplodnosti či chovu hospodářských zvířat.

Seminální proteiny mají u savců, včetně býka, zásadní význam v procesu fertilizace. Vliv polydisperzní povahy proteinů býčí semenné plazmy (BSP), především její hlavní komponenty PDC-109, na jejich funkci však zatím nebyl objasněn.

V předkládané práci se pokusím prohloubit naše znalosti o agregaci proteinů býčí semenné plazmy a navázat tak na svou bakalářskou práci [101].

Cíle diplomové práce:

- purifikovat PDC-109 ze směsi BSP pomocí afinitní chromatografie
- prozkoumat vliv fyzikálních parametrů (koncentrace, pH, iontová síla) a přítomnosti nízkomolekulárních látek (ionty, cukry) na agregaci BSP a PDC-109 metodou gelové chromatografie
- deglykosylačními experimenty zhodnotit vliv glykosylace na agregaci PDC-109
- analyzovat jednotlivé frakce BSP a PDC-109, získané jejich separací gelovou chromatografií, pomocí SDS a RN elektroforézy a gelové chromatografie
- metodou ELBA sledovat vliv výše uvedených faktorů na interakce BSP, PDC-109, resp. jejich frakcí, s biotinylovanými deriváty zvolených látek (simulujícími nativní interakce v průběhu fertilizace) a porovnat s výsledky gelové chromatografie
- pomocí fluorescenční mikroskopie zkoumat vazbu značeného PDC-109 a jeho frakcí na membránu spermií

2. Materiál a metody

2.1 Materiál

2.1.1 Biologický materiál

Býčí ejakuláty byly získány darem (Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem a výzkumný ústav veterinárního lékařství (VUVel), Brno). Proteiny býčí semenné plazmy byly získány centrifugací ejakulátů, dialýzou supernatantu proti destilované vodě a následným zamražením a lyofilizací.

Biotinylované deriváty mannanu, heparinu, lyofilizátu tekutin kravského oviduktu, lyofilizátu tekutin kravské dělohy, chondroitin sulfátu a fosforylcholinu byly připraveny v laboratoři RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D. na katedře biochemie PřF UK.

2.1.2 Chemikálie

Akrylamid	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Avidin-křenová peroxidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bis-Tris	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
β-galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Blue Dextran	- Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Bovine Serum Albumin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Citronan trisodný	- Lachema, Brno, ČR
Coomassie Brilliant Blue G-250	- Serva, Heidelberg, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250	- Serva, Heidelberg, Německo
DEAE-Sephadex A-25	- Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Dodecylsulfát sodný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dusičnan stříbrný	- Lachema, Brno, ČR

Ethanol	- Lachema, Brno, ČR
Fenol	- Biedel-De Haën AG, Seezle-Hannover, Německo
Fluorescein isothiokyanát	- Serva, Heidelberg, Německo
Formaldehyd	- Lachema, Brno, ČR
Fosforylcholin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
L-fukosa	- Serva, Heidelberg, Německo
D-fruktosa	- Lachema, Brno, ČR
D-galaktosa	- Serva, Heidelberg, Německo
β -galaktosidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Gelatin from Porcine Skin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
D-glukosa	- Lachema, Brno, ČR
Glutaraldehyd	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko
Hexosaminidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydrogenfosforečnan uhličitý	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid hořečnatý	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid manganatý	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
<i>myo</i> -Inositol	- Serva, Heidelberg, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová	- Serva, Heidelberg, Německo
Kyselina citronová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina fosforečná	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina chlorovodíková	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina iodistá	- Feinchemie, Sebnitz, Německo
Kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina sírová	- Penta, Chrudim, ČR
Kyselina trichloroctová	- Lachema, Brno, ČR

Lysozym (kopolymer)	- dar (katedra biochemie PřF UK)
D-mannosa	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Merkaptoethanol	- Loba Chemie, Fishamend, Rakousko
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
N-hydroxysukcinimidobiotin	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
N,N-dimethylformamid	- Lachema, Brno, ČR
N,N'-methylenbisakrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin	- Serva, Heidelberg, Německo
Neuraminidasa	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Octan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Ovalbumin	- dar (praktika biochemie PřF UK)
Perboritan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Persíran amonný	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Ponceau R	- Loba-Feinchemie, Wien-Fischamend, Rakousko
Sephadex G-150	- Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden
Síran sodný	- Lachema, Brno, ČR
Síran zinečnatý	- Lachema, Brno, ČR
Thiosíran sodný	- Lachema, Brno, ČR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	- Serva, Heidelberg, Německo
Triton X-100	- Serva, Heidelberg, Německo
Trypsin inhibitor	- Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	- Serva, Heidelberg, Německo
Uhličitan sodný	- Lachema, Brno, ČR

2.1.3 Ostatní materiál

Mikrotitrační polystyrenové destičky pro ELBA testy	- NUNC, Dánsko
--	----------------

2.2 Metody

2.2.1 Purifikace PDC-109 na DEAE-Sephadexu A-25

Roztoky:

A: 1M NaCl, 25mM Tris, pH 6,4

B: 1M NaCl, 25mM Tris, 10mM fosforylcholin, pH 6,4

PBS: 9 g NaCl, 0,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ do 1000 ml, pH 7

Purifikace PDC-109 byla provedena na základě metody popsané v [84]. Na sloupec DEAE-Sephadexu A-25 (2,5 x 7,5 cm), ekvilibrovaný roztokem A, bylo nanášeno 100 mg BSP, rozpuštěného v 10 ml tohoto roztoku, kterým byla poté eluována nenaadsorbovaná frakce až do poklesu A_{280} pod 0,03. Navázaná frakce byla pak eluována roztokem B. Po poklesu A_{280} pod 0,03 byla kolona znovu ekvilibrována roztokem A a celý postup byl opakován. Takto bylo purifikováno PDC-109 z celkem 1200 mg BSP; spojené frakce byly poté dialyzovány proti destilované vodě, zamraženy a lyofilizovány.

Pro purifikaci PDC-109 z jednotlivých frakcí BSP bylo provedeno 5 separací BSP gelovou chromatografií (s nánosy 40 mg) a spojené frakce odpovídající píkům I, II a III (viz kap. 3.2, str. 43) byly poté zasoleny na odpovídající iontovou sílu roztoku A. Následně byly nanášeny na kolonu DEAE-Sephadexu A-25, která byla ekvilibrována roztokem A. Elucí roztokem B byly získány frakce PDC-109, které byly následně dialyzovány proti PBS a použity pro další experimenty.

2.2.2 Gelová chromatografie

Roztoky:

PBS: 9 g NaCl, 0,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ do 1000 ml, pH 7

TBS: 7,6 g NaCl, 2,4 g Tris do 1000 ml, pH 7

Pro účely analýzy velikosti agregátů BSP a PDC-109 (v závislosti na složení elučního roztoku) a separaci jednotlivých frakcí byla použita gelová chromatografie na sloupci Sephadexu G-150 o rozměrech 1 x 60 cm (Pharmacia, Švédsko). Před nanášením vzorku

byl sloupec vždy ekvilibrován příslušným roztokem. Složení těchto roztoků je uvedeno v tab. 2.1. Koncentrace některých látek, jež se vyskytují nativně v semenné plazmě (a jejichž případný efekt na agregaci BSP nás zajímal), byly stanoveny na základě fyziologických hodnot, vyhledaných v literatuře (tab. 2.1).

Tab. 2.1: Složení roztoků pro gelovou chromatografii

Sledovaný faktor	Složení elučního roztoku
Koncentrace proteinu [35]	PBS
pH [28]	PBS, pH 7 nebo upraveno na 5,5, resp. 8,5
Iontová síla [50]	75, 150, 600 a 1200mM NaCl, pH 7
Absence volných dvojmoc. kat. [50]	1mM EDTA v TBS, pH 7
Přítomnost citrátu [85]	30mM citronan trisodný ve 120mM NaCl, pH 7
Přítomnost Ca ²⁺ [85-87]	11mM CaCl ₂ + 1mM EDTA v TBS, pH 7
Přítomnost Mg ²⁺ [85-87]	4,3mM MgCl ₂ + 1mM EDTA v TBS, pH 7
Přítomnost Mn ²⁺ [87]	0,4mM MnCl ₂ + 0,2mM EDTA v TBS, pH 7
Přítomnost Zn ²⁺ [88]	0,6mM ZnSO ₄ + 0,3mM EDTA v TBS, pH 7
Přítomnost D-glukosy [86,89]	1,5 mg/ml D-Glc v PBS, pH 7
Přítomnost D-fruktosy [85]	5 mg/ml D-Fru v PBS, pH 7
Přítomnost D-Gal [*]	1 mg/ml D-Gal v PBS, pH 7
Přítomnost D-Man [*]	1 mg/ml D-Man v PBS, pH 7
Přítomnost L-Fuc [*]	1 mg/ml L-Fuc v PBS, pH 7
Přítomnost <i>myo</i> -inositolu [89]	0,35 mg/ml Ins v PBS, pH 7
Přítomnost fosforylcholinu ^{**} [50]	10mM PrC v TBS, pH 7
Přítomnost merkaptoethanolu ^{***}	PBS (1% ME pouze ve vzorku)
Ostatní (např. deglykosylace)	PBS

V tabulce je uvedeno složení elučních roztoků pro jednotlivé experimenty (sledovaný faktor = faktor, jehož vliv na agregaci BSP, resp. PDC-109 jsme sledovali). Pro látky, které se vyskytují nativně v semenné plazmě bývá a/nebo byly zkoumány v jiných studiích (v souvislosti s agregací BSP) jsou uvedeny odkazy na literaturu, na základě které byly stanoveny koncentrace těchto látek v našich experimentech

* Jelikož nebyla příslušná fyziologická koncentrace v literatuře nalezena, byla hodnota zvolena arbitrárně (s ohledem na podobnou D-glukosu, jejíž fyziologická koncentrace je známa)

** Simulace vazby proteinu na fosfocholinové lipidy

*** Zkoumání vlivu oxidace/redukce –SH skupin proteinu

Vzorky (proteiny, rozpuštěné v daném roztoku), byly nanášeny v objemech 0,2 - 2 ml na kolonu (po odstranění případného peletu centrifugací). Frakce byly jímány do zkumavek po 28 kapkách (cca 1,5 ml) kolektorem zn. BioRad. Absorbance jednotlivých frakcí byly proměřeny na spektrofotometru Heλios (Thermo Electron Corporation) při 280 nm. Objem každé frakce byl stanoven z rozdílu váhy zkumavky před a po jímání s přesností 0,1 g (za předpokladu hustoty elučních roztoků $\rho \approx 1 \text{ g / ml}$). Ze získaných údajů byl sestrojen graf závislosti absorbance na elučním objemu. Kalibrace pro určení relativních molekulových hmotností z elučních grafů byla provedena pomocí standardů o známých M_r , a to BSA (M_r 67000), ovalbuminu (M_r 45000), lysozymu (M_r 14500) a bromfenolové modři (M_r 670 – A měřena při 600 nm). Kalibrační graf byl sestrojen vynesemím lineární závislosti logaritmů M_r na elučních objemech daných standardů. Pro zjištění zádržného objemu byl použit Blue Dextran.

2.2.3 Biotinylace BSP a PDC-109

BSP a PDC-109 byly biotinylovány dle metody popsané v [90]. Roztok 50 mg proteinu v 5 ml 0,5M NaHCO₃ byl smíchán s roztokem 1 mg NHS-biotinu v 50 μ l DMF. Poté byla směs jemně třepána na třepačce po dobu 30 min. Produkt byl nakonec dialyzován proti destilované vodě, zamražen a lyofilizován.

2.2.4 Značení PDC-109 fluorescein-thioisokyanátem (FITC)

Roztoky:

A: 10 mg FITC barviva v 0,5 ml DMF a 4 ml ethylenglykolu

Na základě metody popsané v [91] bylo provedeno značení PDC-109 fluorescein-thioisokyanátem. PDC-109 (25 mg) bylo rozpuštěno ve 4 ml bikarbonátového pufru pH 8,5. Poté bylo přidáno 200 μ l roztoku A. Výsledný roztok byl třepán na třepačce v lednici při 4 °C po dobu 1 hod. Poté bylo přidáno dalších 200 μ l roztoku A a opět třepáno 1 hod v lednici. Tento krok byl zopakován ještě 2x (celkový objem přidaného roztoku A byl 800 μ l). Poté byl roztok dialyzován proti vodovodní vodě s přidavkem ½ lžičky aktivního uhlí. Dále pak proti PBS při 4 °C. Na kolonu Sephadexu G-150 ekvilibrovanou v PBS pak byly nanášeny 2 ml výsledného produktu a jednotlivé frakce byly společně se zbývajícím

vzorkem zředěny pomocí PBS na koncentraci 0,2 mg proteinu / ml a uchovány pro účely fluorescenční mikroskopie.

2.2.5 Enzymatická deglykosylace PDC-109

Enzymatická deglykosylace [92] byla provedena pomocí následujících glykosidas:

- neuraminidasa (*C. perfringens*)
- β -galaktosidasa (*E. coli*)
- hexosaminidasa (*A. niger*)

Roztoky:

PBS: 9 g NaCl, 0,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ do 1000 ml, pH 7

Pro enzymatickou desializaci bylo 10 mg PDC-109 rozpuštěno ve 2 ml 0,1M acetátového pufru (pH 5,8) s nepatrným přídatkem NaN_3 . Poté byla přidána neuraminidasa v množství 0,025 U. Po 24 hod inkubace při 37 °C byl vzorek zamražen a uchován pro další experimenty.

Pro sekvenční deglykosylaci bylo rozpuštěno 6 mg PDC-109 ve 2 ml PBS (pH 6) s nepatrným přídatkem NaN_3 a inkubováno s neuraminidasou v množství 0,025 U. Po 12 hod inkubace při 37 °C byla přidána β -galaktosidasa v množství 0,700 U společně s MgCl_2 do výsledné koncentrace 10mM (Mg^{2+} je kofaktor enzymu) a vzorek byl inkubován dalších 12 hod při 37 °C. Poté byla přidána hexosaminidasa a vzorek byl inkubován po dobu dalších 12 hod při 37 °C a následně zamražen a uchován pro další experimenty.

2.2.6 ELBA (Enzyme-Linked Binding Assay)

Metoda ELBA byla použita pro sledování interakce BSP a PDC-109 s biotinylovanými deriváty vybraných látek dle tab. 2.2 za různých podmínek. Byla provedena s použitím mikrotitračních polystyrenových 96jamkových destiček (NUNC, Dánsko).

Tab. 2.2: Přehled vybraných biotinylovaných derivátů použitých pro metodu ELBA

Biotinylovaný derivát	Simulovaná nativní interakce BSP, resp. PDC-109
Mannan	s mannosylovými receptory zony pellucidy
Heparin	s heparinem a heparinu podobnými glykosaminoglykany
Látky tekutin oviduktu	s proteiny/GAG, obs. v tekutinách oviduktu
Látky tekutin dělohy	s proteiny/GAG, obs. v tekutinách dělohy
Fosforylcholin	s fosfocholinovými lipidy membrány spermie
Chondroitin sulfát	s jiným GAG než heparinem
BSP	s BSP
PDC-109	s PDC-109

Roztoky:

A: 1% BSA v PBS

B: 1% glutaraldehyd v dest. vodě

C: 0,1% TWEEN v PBS

D: 1 mg ABTS, 10 mg NaBO₃·4H₂O do 12 ml 0,1M citrát-fosfátového pufru pH 4,6

PBS: 9 g NaCl, 0,2 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O, 1,2g Na₂HPO₄ · 12 H₂O do 1000 ml, pH 7

TBS: 7,6 g NaCl, 2,4 g Tris do 1000 ml, pH 7

Destička byla nejprve aktivována roztokem A (100 µl/jamka) po dobu 1 hod za jemného třepání. Pak byla 3x promyta PBS (200 µl/jamka) během 10 min. Poté byl přidán roztok B (100 µl/jamka) a reakce probíhala za jemného třepání 1 hod. Destička pak byla 4x promyta destilovanou vodou během 2 hod (200 µl/jamka). Po promytí byl aplikován nebiotinylovaný vzorek v koncentraci 1 mg/ml PBS (100 µl/jamka); pro snížení rizika náhodné chyby byl každý vzorek nanášen 3x. Inkubace probíhala po dobu 1 hod. Následovalo 3x promytí roztokem C (200 µl/jamka; 10 min) a poté byly zbylé –CHO

skupiny glutaraldehydu deaktivovány pomocí roztoku A (100 µl/jamka; 1 hod). Pak byla destička znovu 3x promyta roztokem C (200 µl/jamka; 10 min). Následně byl aplikován biotinylovaný derivát vybrané látky dle tab. 2.2 (str. 35) v koncentraci 1 mg/ml v příslušném roztoku dle tab. 2.1 na str. 32 (v případě cukrů, inositolu a iontů byly použity též 5x vyšší, resp. 5x nižší koncentrace těchto látek; v případě CaCl_2 v 5x vyšší koncentraci byl použit 2x zředěný TBS pro korekci iontové síly; 100 µl/jamka; 1 hod) a destička byla opět 3x promyta roztokem C (200 µl/jamka; 10 min). Poté byl nanesen roztok avidin peroxidázy (avidin-HRP) o koncentraci 0,25 mg/ml PBS (100 µl/jamka; 1 hod) a následovalo další promytí roztokem C. Nakonec byl aplikován substrát pro avidin-HRP (roztok D). Průběh reakce byl detekován na spektrofotometru SUNRISE (TECAN) měřením absorpance při 405 nm (zelená barva produktu). Výsledky byly zpracovány do sloupcového diagramu.

2.2.7 SDS-PAGE

Pro analýzu frakcí BSP, získaných separací gelovou chromatografií, a PDC-109, purifikovaného z těchto frakcí, byla použita diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS dle Laemliho [93].

Roztoky:

A: Roztok akrylamidu: 29,2 g AA, 0,8 g bis(AA) do 100 ml H_2O

B: 1,5M Tris.HCl, pH 8,3

C: 0,5M Tris.HCl, pH 6,8

D: Elektrodotový pufr (4x konc.): 15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS do 1000 ml, pH 8,3

E: 4% zaostřovací gel: 1500 µl H_2O + 625 µl C + 325 µl A + 25 µl 10% SDS + 40 µl 0,1% bromfenolové modři; těsně před aplikací přidáno 3,8 µl TEMED + 35 µl 10% APS

F: 12% separační gel: 4 ml A + 2,5 ml B + 3,5 ml H_2O + 0,1 ml 10% SDS; těsně před aplikací přidáno 4,5 µl TEMED + 40 µl 10% APS

G: 15% separační gel: 5 ml A + 2,5 ml B + 2,5 ml H_2O + 0,1 ml 10% SDS; těsně před aplikací přidáno 4,5 µl TEMED + 40 µl 10% APS

H: Vzorkový pufr neredukující: 7 ml H_2O + 2 ml C + 3,4 ml glycerolu + 3 ml 10% SDS + 0,4 ml 0,1% bromfenolové modři

S pomocí aparatury zn. BioRad byl připraven gel: roztok F nebo G (podle toho, zda jsme chtěli 12% nebo 15% gel) byl nalit mezi skla a zalitý dest. vodou ponechán zpolymerovat (asi 0,5 hod). Poté byl aplikován roztok E, přičemž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek. Po polymeraci (asi 10 min) byl hřeben opatrně vysunut, aparatura byla vložena do vany a do katodového i anodového (zde po okraj) prostoru byl nalit roztok D. Vzorky a standardy (kopolymer lysozymu, BSA) byly rozpuštěny v roztoku H, krátce povařeny na vodní lázni a v množství odpovídajícímu 1-10 µg proteinu byly následně aplikovány do jamek v gelu. Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí (přístroj ElectrophoresisConstant Power Supply 3000/150, Pharmacia) a nastaveno počáteční napětí 70 V. Poté, co proteiny dosáhly separačního gelu, bylo napětí zvýšeno na 130 V a ponecháno až do konce elektroforézy (1 - 2 hod). Nakonec byla aparatura odpojena, gel vyjmut (odříznut zaostřovací gel) a použit pro další zpracování analytickými metodami, popř. byl použit pro želatinovou zymografii.

2.2.8 RN-PAGE (Red Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Pro analýzu frakcí BSP, získaných separací gelovou chromatografií, a PDC-109, purifikovaného z těchto frakcí, byla použita červená nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti barviva Ponceau RR [94-96].

Roztoky:

A: Roztok akrylamidu: 29,2 g AA, 0,8 g bis(AA) do 100 ml H₂O

B: Anodový pufr: 50mM Bis-Tris/HCl, pH 7

C: Katodový pufr: 50mM Tricin, 15mM Bis-Tris/HCl, 0,012% Ponceau RR, pH 7

D: Vzorkový pufr: 50mM Bis-Tris/HCl, 20% glycerol, 0,02% Ponceau RR, pH 7

E: 3% Zaostřovací gel: 1500 µl H₂O + 625 µl B + 325 µl A + 29,4 µl 1% Ponceau RR; těsně před aplikací přidáno 3,8 µl TEMED + 35 µl 10% APS

F: 10% Separační gel: 3,3 ml A + 2,5 ml B + 4,2 ml H₂O + 0,12 ml 1% Ponceau RR; těsně před aplikací přidáno 4,5 µl TEMED + 40 µl 10% APS

S pomocí aparatury zn. BioRad byl připraven gel: roztok F byl nalit mezi skla a zalitý vodou ponechán zpolymerovat (asi 1 hod). Poté byl aplikován roztok E, přičemž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek. Po polymeraci (asi 10 min) byl hřeben opatrně vysunut,

aparatura byla vložena do vany a do katodového i anodového (zde po okraj) prostoru byl nalit roztok C. Vzorky a standard (BSA) v množství 1-10 µg proteinu v roztoku D byly následně aplikovány do jamek v gelu. Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí (přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150, Pharmacia) a nastaveno počáteční napětí 70 V. Po dosažení separačního gelu proteiny (cca 30 min) bylo napětí zvýšeno na 130 V a ponecháno až do konce elektroforézy (cca 2 hod). Aparatura byla odpojena, gel vyjmut (odříznut zaostřovací gel) a dále analyzován.

2.2.9 Detekce proteinů v gelu po elektroforéze - barvení CBB

Roztoky:

A: 0,5 g CBB, 450 ml metanolu + 100 ml kys. oct. + 450 ml H₂O

B: 250 ml metanolu + 100 ml kys. oct. + 650 ml H₂O

Gely z elektroforézy byly nejprve inkubovány 2 hod v roztoku A. Následovalo odbarvení v roztoku B. Odbarvené a vodou omyté gely byly nakonec zataveny v celofánu.

2.2.10 Detekce proteinů v gelu po elektroforéze - barvení stříbrem

Roztoky:

A: 120 ml kys. oct. + 500 ml ethanolu + 500 µl 35% formaldehydu

B: 20% ethanol

C: 0,02% Na₂ S₂O₃

D: 2g AgNO₃, 760 µl 35% formaldehydu do 1000 ml H₂O

E: 60g Na₂CO₃, 4 mg Na₂ S₂O₃, 500 µl 35% formaldehydu do 1000 ml H₂O

F: 12% kys. octová

Barvení gelů stříbrem pro detekci proteinů bylo provedeno dle [97]. Gely z elektroforézy byly nejprve 2 hod inkubovány ve fixačním roztoku A, následně promyty 3x během 20 min roztokem B. Poté byly na 2 min ponořeny do senzitivizujícího roztoku C, krátce promyty v dest. vodě a barveny 20 min v roztoku D. Po krátkém opláchnutí dest. vodou byly vyvolány v roztoku E. Po dosažení požadovaného vzhledu byla reakce terminována roztokem F. Následovalo omytí a zatavení gelu do celofánu.

2.2.11 Detekce glykoproteinů v gelu po elektroforéze - barvení stříbrem

Roztoky:

A: 20% roztok TCA

B: 1% roztok HIO_4

C: 230 ml Ethanolu + 770 ml H_2O

D: 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

E: 0,2% roztok AgNO_3

F: 60 g Na_2CO_3 , 4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 500 μl 35% formaldehydu do 1000 ml H_2O

G: 12% kys. octová

Po proběhnutí elektroforézy byly gely nejprve 30 min fixovány v roztoku A a poté 30 min oxidovány v roztoku B. Po promytí (4x během 20 min) roztokem C byly gely ponořeny do senzitivizujícího roztoku D a znovu promyty, 3x během 20 min, roztokem B. Poté byly na 2 min ponořeny do senzitivizujícího roztoku C, krátce promyty v dest. vodě a barveny 60 min v roztoku E. Po krátkém opláchnutí dest. vodou byly vyvolány v roztoku F. Po dosažení požadovaného vzhledu byla reakce terminována roztokem G, gely opláchnuty a zataveny do celofánu.

2.2.12 Želatinová zymografie

Roztoky:

A: 50mM Tris/HCl, 5mM CaCl_2 , pH 8,4

B: 50mM Tris/HCl, 5mM CaCl_2 , 5mM EDTA, pH 8,4

C: 50mM Tris/HCl, 5mM CaCl_2 , trypsin inhibitor (1 mg/ml), pH 8,4

Želatinová zymografie pro detekci proteasové aktivity preparátu byla provedena dle metody popsané v [98]. Postupem popsáným v kap. 2.2.7 (str. 36) byly připraveny dva 12% gely – s přídavkem a bez přídavku 0,15% želatiny. Proteinový preparát byl nanášen v neredukujícím pufru v množství 10 μl na gel obs. želatinu. Na druhý gel byl nanesen kopolymer lysozymu jako marker M_r . Po skončení SDS-elektroforézy byl gel neobsahující želatinu barven pomocí CBB. Gel obs. želatinu byl během 1 min 3x promyt dest. vodou. K odstranění SDS byl pak gel inkubován v 2,5% Tritonu X-100 po dobu 1 hod, během této

dobu byl promývací roztok 4x vyměněn. Poté byl znovu promyt 3x během 1 min a rozříznut na tři části (tak aby každá obsahovala 2 dráhy s proteinovým preparátem) a jednotlivé fragmenty byly inkubovány v roztocích A (bez inhibitoru), resp. B (s inhibitorem metaloproteas), resp. C (s trypsin inhibitorem), po dobu 18 hod při 37 °C. Nakonec byly gely propláchnuty dest. vodou a barveny pomocí CBB. Jejich srovnáním s gelem neobs. želatinu (marker) můžeme usuzovat na M_r případných proteas.

2.2.13 Stanovení obsahu neutrálních cukrů dle Duboise

Byl stanoven obsah neutrálních sacharidů dle Duboise [99] BSP frakcí z gelové chromatografie a PDC-109, purifikovaného z těchto frakcí (koncentrace proteinu v rozmezí 0,2 – 0,5 mg/ml) K 1 ml vzorku s neznámým obsahem neutrálních sacharidů bylo z dávkovací lahve přidáno 0,5 ml 5% roztoku fenolu a dále 2,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Po protřepání byly směsi ponechány stát při laboratorní teplotě cca 30 min. Byla změřena absorbance proti prázdné kontrole (1 ml PBS + 0,5 ml 5% fenolu + 2,5 ml kys. sírové) při 490 nm. Ke kalibraci byla použita D-glukosa v sadě koncentrací (0, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,003125, 0,00156, 0,000781, 0,00039 mg/ml).

2.2.14 Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Bradfordové [100].

Roztoky:

A: činidlo Bradforové: 0,01 g Coomassie Brilliant Blue G250, 5 ml 96% ethanolu + 10 ml 85% kyseliny fosforečné, doplnit do 100 ml vodou

K 0,1 ml vzorku s neznámým obsahem proteinu bylo přidáno 5 ml roztoku A. Po 5 min stání při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 595 nm. Ke kalibraci byl použit BSA v sadě koncentrací (0,1 – 1,0 mg/ml).

2.2.15 Fluorescenční mikroskopie

Metodou fluorescenční mikroskopie byla sledována interakce jednotlivých frakcí značeného PDC-109, získaných rozdělením na gelové chromatografii.

Pro tento experiment byly použity spermie, získané v den experimentu. Čerstvě ejakulované spermie byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a centrifugovány při 600 g po dobu 5 min. Supernatant byl odebrán a získaný pelet resuspendován ve fyziologickém roztoku. Uvedený postup byl ještě 2x zopakován.

Poté byly pelety resuspendovány v 200 μ l připravených vzorků (v PBS) značených FITC barvivem (koncentrace proteinu ve vzorcích byla 0,2 mg/ml) po dobu 10 min. Nakonec byl proveden nátěr na sklíčko a fluorescence byla pozorována na mikroskopu Nikon Elipse TE2000-U (kamera Mutech, PixelINK) na katedře biochemie PřF UK.

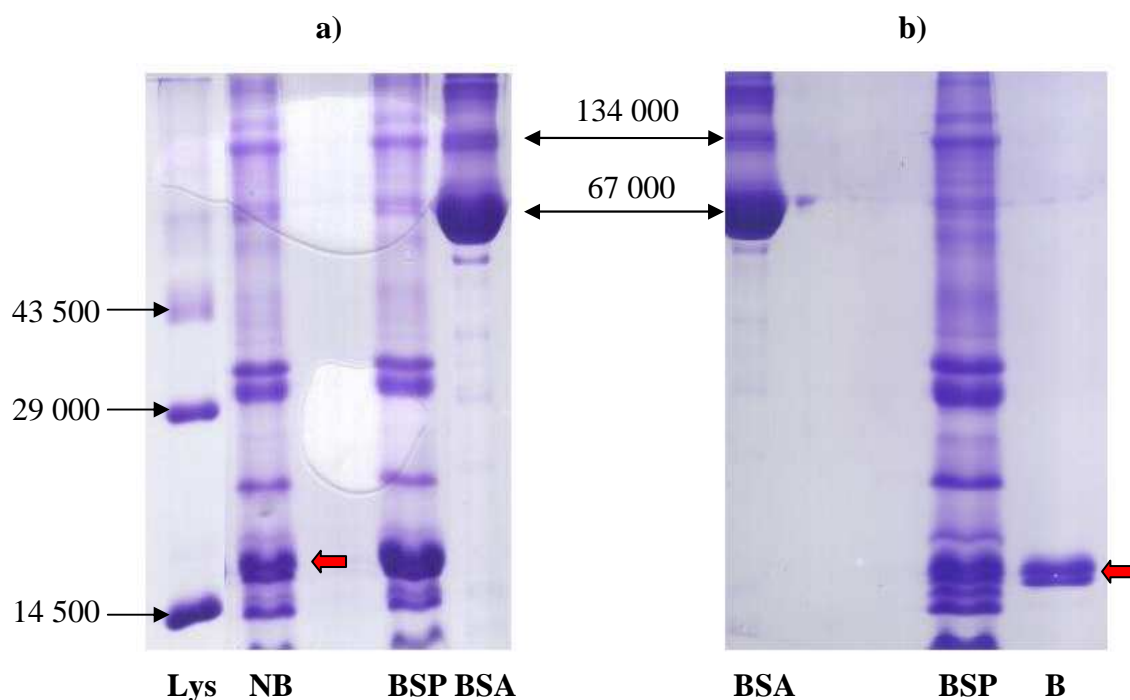
3. Výsledky

3.1 Purifikace PDC-109 na DEAE-Sephadexu A25

Purifikace byla provedena z celkového množství 1200 mg BSP. Výtěžek čistého PDC-109 byl 290 mg, neadsorbovaného BSP 860 mg, tj. ztráty byly 50 mg ($1200 - 290 - 860 = 50$).

Výtěžek PDC-109 představuje tedy cca 24% celkových BSP, navíc pravděpodobně značná část PDC-109 nebyla na koloně adsorbována (obr. 3.1a).

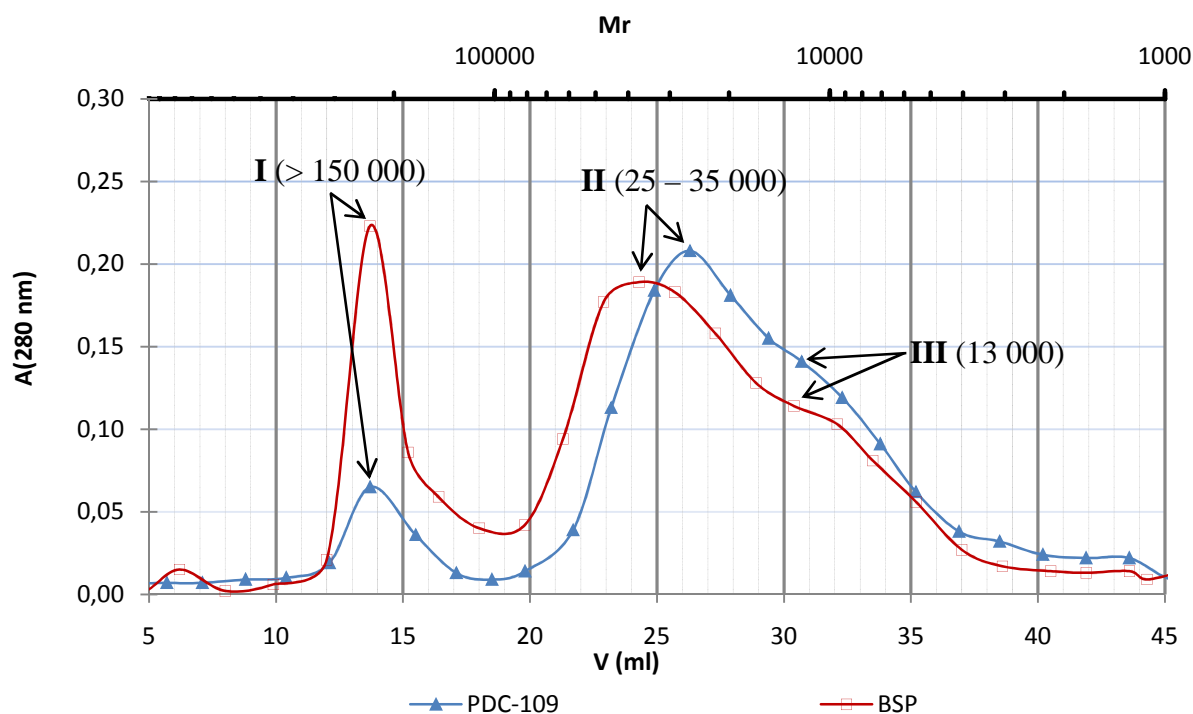
Úspěšnost purifikace PDC-109 byla ověřena pomocí SDS-PAGE (obr. 3.1b). Dublet, který se objevuje v dráze purifikovaného PDC-109 (dráha B), odpovídá zřejmě glykosylované a neglykosylované formě [70].



Obr. 3.1: SDS elektroforéza (15% polyakrylamidový gel) BSP před a po afinitní chromatografii **a)** srovnání prošlé frakce s nanášeným vzorkem (BSP) - šipka označuje PDC-109, který se nenavázal **b)** srovnání navázané frakce s nanášeným vzorkem - šipka označuje purifikovaný PDC-109; jsou vyznačeny M_r použitých standardů.

(Lys = kopolymer lysozymu, B = navázaná frakce, NB = nenavázaná frakce, BSA = hovězí sérový albumin). Barveno pomocí CBB.

3.2 Srovnání BSP a PDC-109 na gelové chromatografii



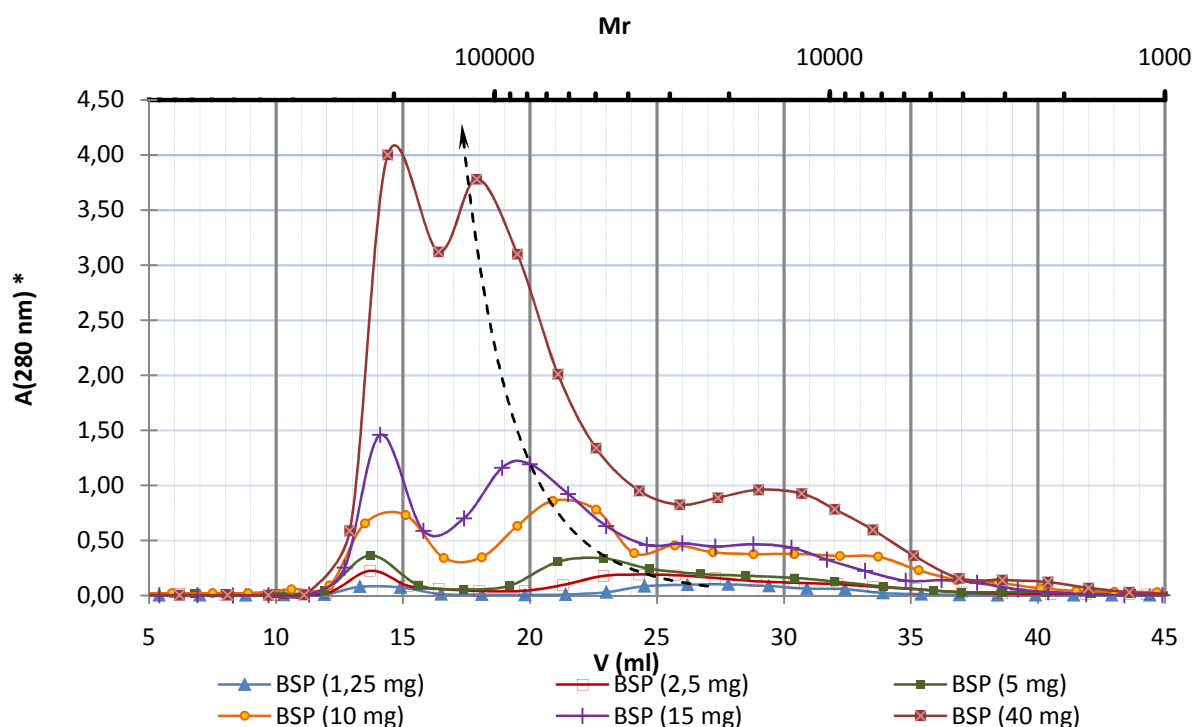
Obr. 3.2: Srovnání gelové chromatografie BSP a PDC-109; proteiny (2,5 mg) byly rozpuštěny v PBS pH 7 a naneseny na kolonu, ekvilibrovanou stejným pufrem. Římskými číslicemi jsou označeny jednotlivé frakce, uvedeny jsou též jejich zdánlivé molekulové hmotnosti (vypočtené z kalibrace). Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

Obr 3.2 zobrazuje chromatograf BSP, resp. PDC-109, při naneseném množství 2,5 mg. Frakce I představuje zádržný objem kolony a v tomto objemu putují proteiny a agregáty o $M_r > 150\,000$ (byl použit Sephadex G-150). Ve frakci II se vyskytují proteiny okolo M_r 30000 a sestávají pravděpodobně z dimeru PDC-109, v případě BSP též BSP-30 kDa. Frakce III odpovídá M_r okolo 13000 a představuje monomer PDC-109 a u BSP též BSP-A3 a aSFP. Podrobněji jsou jednotlivé frakce popsány v kapitole 3.5 (str. 61). Z grafu je patrný o něco nižší obsah plochy pod křivkou PDC-109 - rozdíl byl zřejmě způsoben poněkud horší rozpustností tohoto proteinu, purifikovaného afinitní chromatografií (před nanesením na kolonu bylo vždy nutné odstranit nerozpuštěný protein centrifugací). Pro korekci vlivu koncentrace proteinů na jejich eluční profil (srovnej kap. 3.3.1, str. 44) byly jednotlivé chromatografy ve všech dalších experimentech porovnávány vždy s kontrolou, nanesenou v přibližně stejném množství ($\pm 0,2$ mg) a objemu.

3.3 Vliv vybraných fyzikálních parametrů na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109

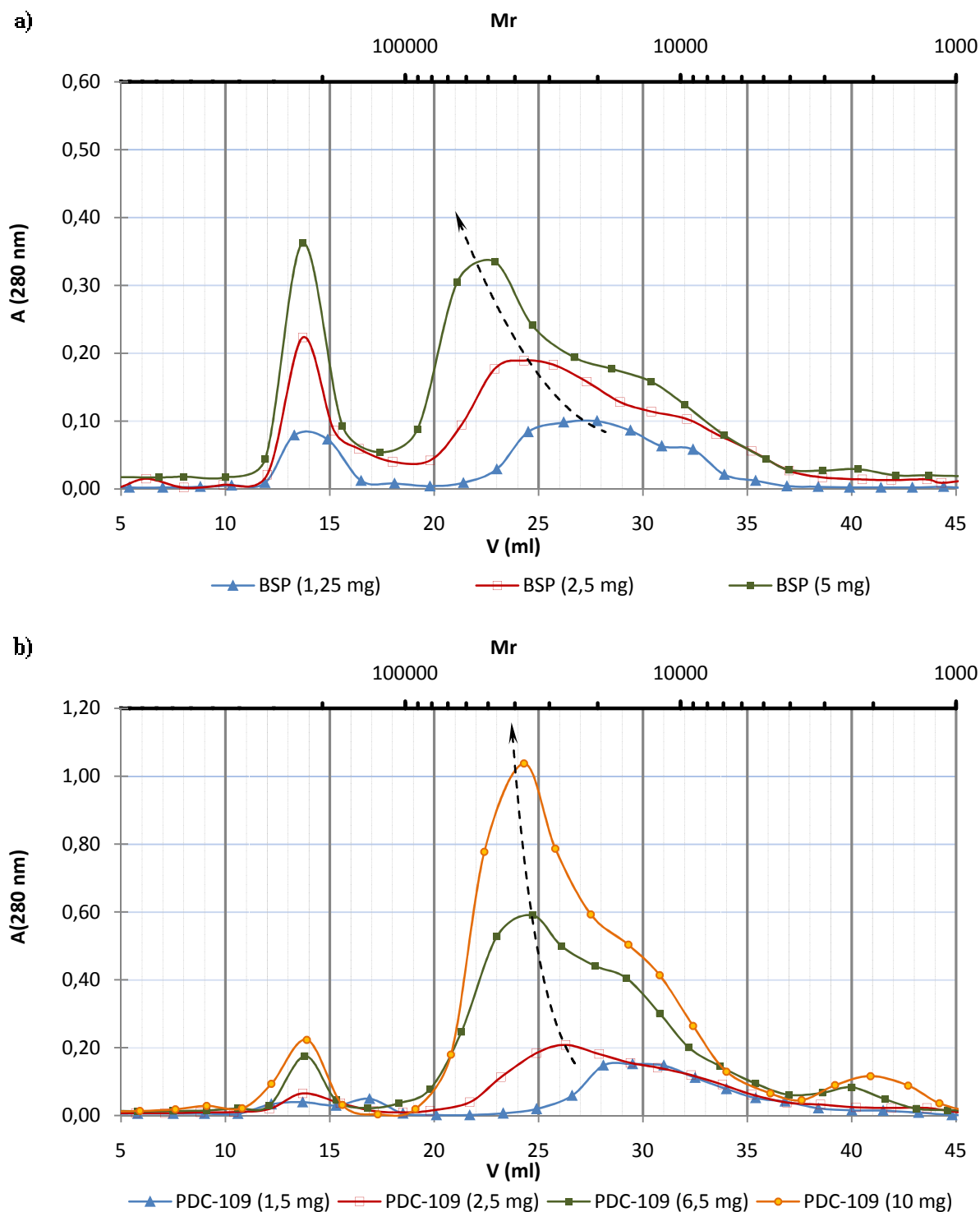
3.3.1 Vliv koncentrace proteinů na jejich agregaci

Na obr 3.3 jsou zobrazeny eluční profily BSP z gelové chromatografie při různých koncentracích těchto proteinů. Na obr. 3.4a (str. 45) jsou pro lepší přehlednost znázorněny chromatografy při nejnižších koncentracích v podrobnějším měřítku. Je patrný posun píku odpovídající frakci II (viz kap 3.2, str. 43), který se při nanesení 2,5 mg objevuje při cca 25 ml ($M_r \approx 30000$), zatímco při nanesení 40 mg se objevuje už při cca 18 ml ($M_r > 100000$). Při 1,25 mg je patrný až okolo 28 ml a splývá tak téměř s píkem frakce III. Pozice píků, odp. frakcím I a III, se v závislosti na koncentraci nemění. U PDC-109 (obr. 3.4b, str. 45) je vidět podobná, ačkoliv méně výrazná tendence prostředního píku. Na rozdíl od BSP však již při 1,5 mg zcela splývá z píkem frakce III.



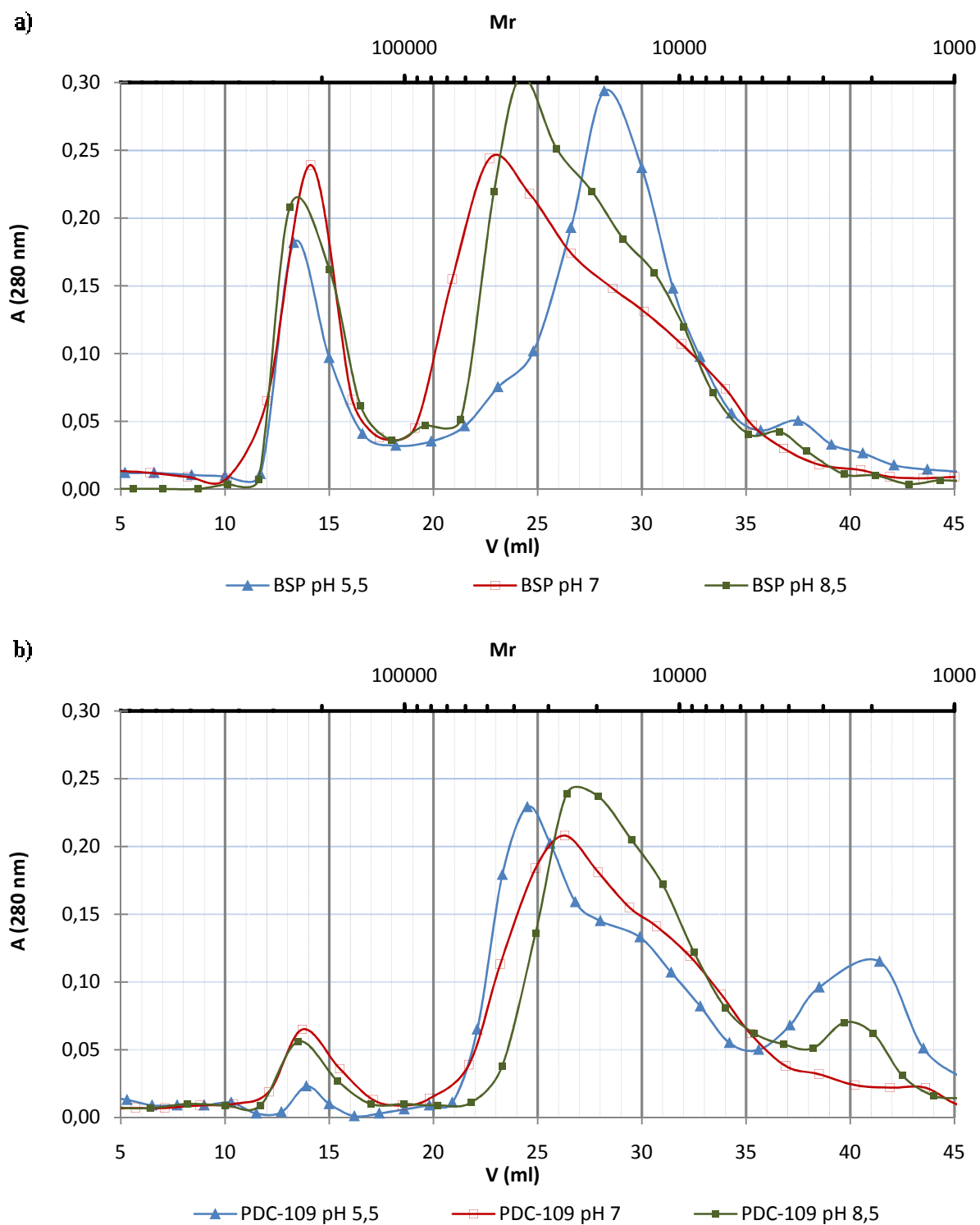
Obr. 3.3: Gelová chromatografie BSP při různých koncentracích proteinů; proteiny byly rozpuštěny v 0,5 ml PBS pH 7 a naneseny na kolonu, ekvilibrovanou stejným pufrém. Pro lepší znázornění je maximy prostředních píků jednotlivých chromatografií proložena křivka, která demonstruje posun těchto píků směrem k vyšším M_r s rostoucí koncentrací nanesených vzorků. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

* Pro korekci nelinearity závislosti A na konc. byly při $A > 1$ frakce proměřeny zředěné a naměřená hodnota zpětně vynásobena zředovacím faktorem.



Obr. 3.4: Gelová chromatografie a) BSP b) PDC-109; při různých koncentracích proteinů; proteiny byly rozpuštěny v 0,5 ml PBS pH 7 a nanесeny na kolonu, ekvilibrovanou stejným pufrém. Pro lepší znázornění je maximy prostředních píků jednotlivých chromatografiů proložena křivka, která demonstruje posun tohoto píku směrem k vyšší M_r s rostoucí koncentrací nanесených vzorků. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

3.3.2 Vliv pH na agregaci BSP a PDC-109

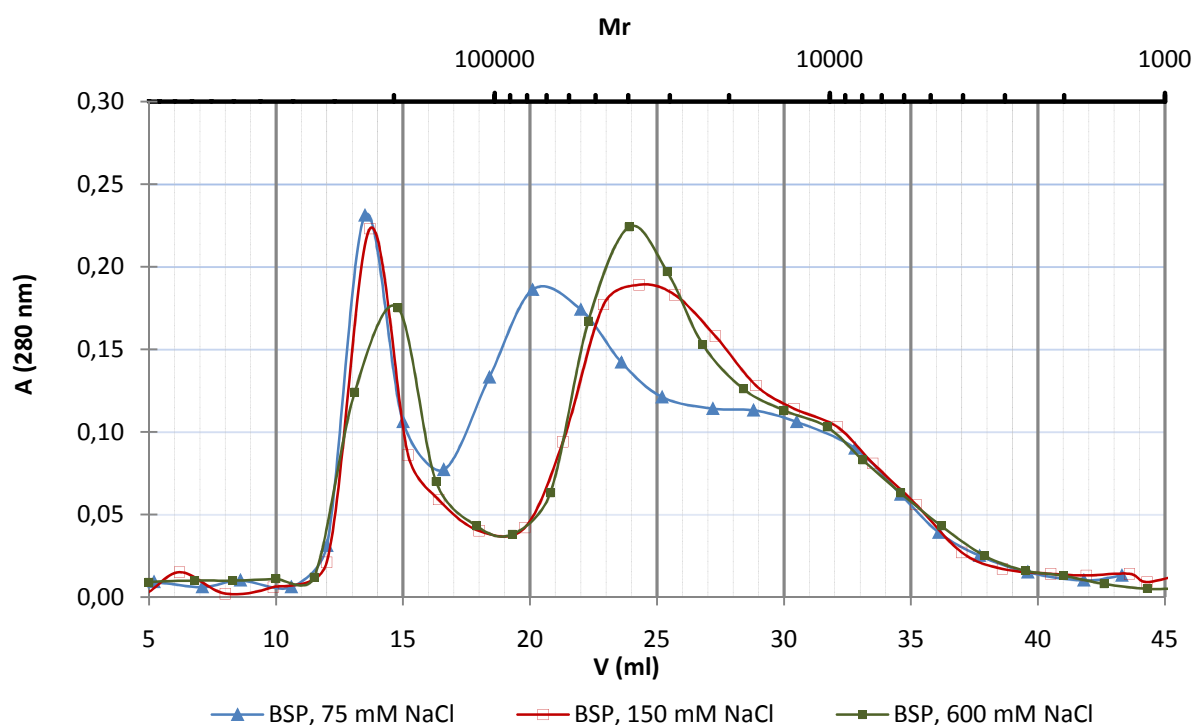


Obr. 3.5: Gelová chromatografie a) BSP b) PDC-109; při různých pH; proteiny (2,5 mg) byly rozpuštěny v 0,5 ml PBS o příslušném pH a nanесeny na kolonu, ekvilibrovanou stejným pufrém. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

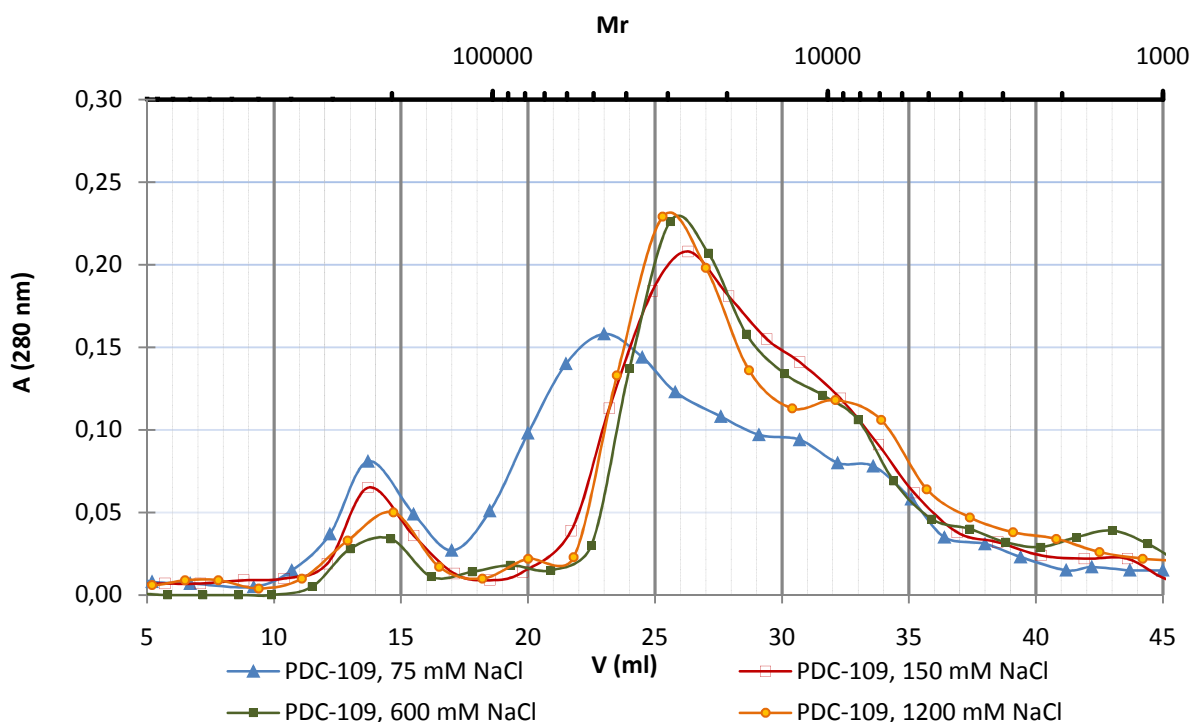
Na obr. 3.5 (str. 46) je znázorněno, jaký je vliv pH roztoku na eluční profily BSP a PDC-109. V mírně zásaditém pH je u obou vzorků pozorován malý posun píku II směrem k píku III, naznačující posunutí rovnováhy monomer/dimer směrem k monomeru. V mírně kyselém pH je však chování BSP a PDC-109 odlišné. V případě PDC-109 se navíc zřetelně snižuje zastoupení frakce I, což je v souladu se závěry uvedenými v [28]. Pík na pozici okolo 40 ml u PDC-109 bude diskutován v kap. 3.5 na str. 61.

3.3.3 Vliv iontové síly na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109

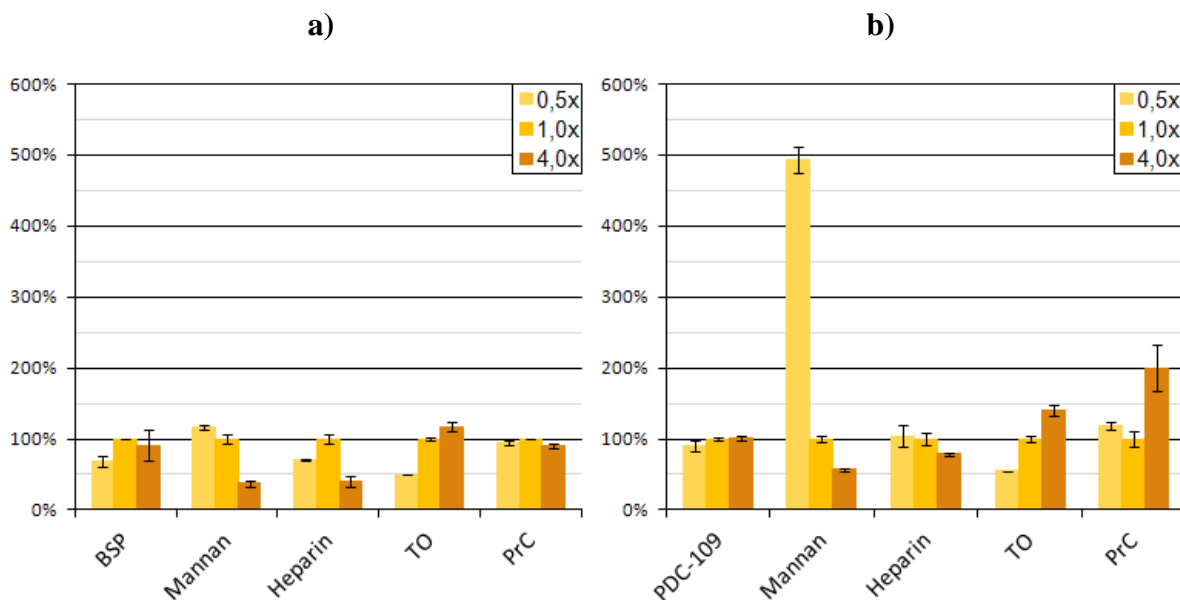
Z obr. 3.6 a 3.7 je u obou vzorků patrný posun píku II směrem k vyšším M_r při nízké iontové síle. Při vysokých koncentracích NaCl dochází ke zmenšení píku I u PDC-109 (v souladu s výsledky z [28]). Metodou ELBA byl zkoumán vliv iontové síly na interakce proteinů s vybranými biotinylovanými preparáty (obr. 3.8). Výrazné je zvýšení interakce PDC-109 s mannanem při nízké a inhibice při vysoké iontové síle. Zvýšení interakce PDC-109 s fosforylcholinem při vysoké iontové síle je v souladu s tím, že je PDC-109 lépe eluován roztokem fosforylcholinu při vyšší konc. NaCl (1M) během purifikace [50, 84].



Obr. 3.6: Gelová chromatografie BSP při různých koncentracích NaCl; proteiny (2,5 mg) byly rozpuštěny v příslušném roztoku NaCl a naneseny na kolonu, ekvilibrovanou stejným roztokem. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.



Obr. 3.7: Gelová chromatografie BSP při různých koncentracích NaCl; vzorky (2,5 mg) byly rozpuštěny v příslušném roztoku NaCl a nanášeny na kolonu, ekvilibrovanou stejným roztokem. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.



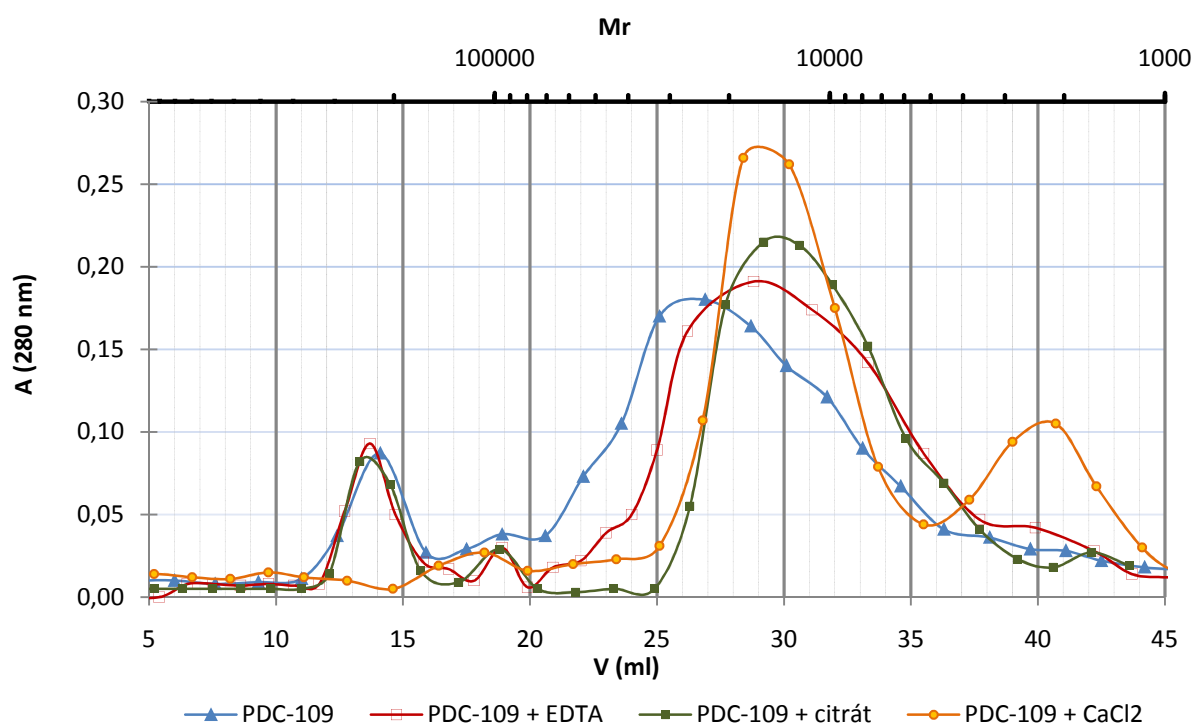
Obr. 3.8: Síla interakce a) BSP b) PDC-109; s biotinylovanými deriváty vybraných vzorků při různých koncentracích NaCl; jako 100% byla zvolena příslušná interakce ve 150mM NaCl (1,0x). (TO = látky z tekutin oviduktu, PrC = fosforylcholin; hodnoty v legendě znamenají příslušný násobek koncentrace NaCl, tj. 75mM, 150mM, 600mM). Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

3.4 Vliv přítomnosti některých nízkomolekulárních látek na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109

3.4.1 Vliv přítomnosti Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , EDTA a citrátu na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109

Jelikož byla většina experimentů prováděna v PBS, byl zkoumán možný vliv fosfátů (vyšší koncentrace $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ v PBS) a Na^+ (místo NaCl použit KCl) na agregaci BSP pomocí gelové chromatografie. Výsledky neprokázaly žádnou signifikantní změnu v elučním profilu BSP v takto modifikovaných pufrách oproti PBS (nezobrazeno).

Pro sledování vlivu iontů byl použit TBS místo PBS. Rozdíl agregačního chování BSP v těchto pufracích systémech je patrný ze srovnání obr. 3.2 (str. 43) a 3.11a (str. 51). Pík II v TBS (130mM NaCl vs. 150mM NaCl v PBS) vykazuje podobnou tendenci, jako při nízké koncentraci NaCl (kap 3.3.1 na str. 44). Agregační profily PDC-109 se v PBS a v TBS nijak výrazně neliší (srovnej obr. 3.2, str. 43 a obr. 3.11b, str. 51).

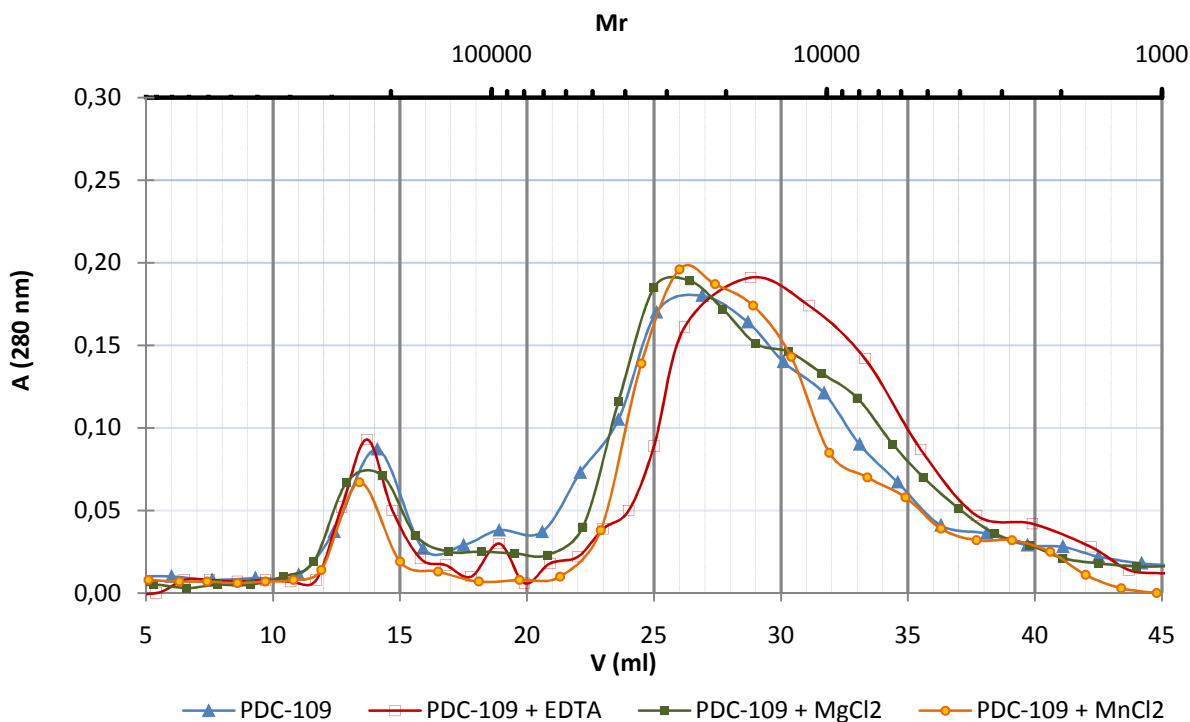


Obr. 3.9: Gelová chromatografie PDC-109 v přítomnosti EDTA, citrátu a CaCl_2 ; vzorky (2,5 mg) byly nanесeny v TBS pH 7, obs. 1mM EDTA, resp. 11mM CaCl_2 + 1mM EDTA, na kolonu, ekvilibrovanou stejným roztokem. Jako kontrola je zobrazen chromatograf BSP v TBS pH 7. Ke sledování vlivu citrátu byl použit 30mM citronan trisodný ve 120mM NaCl, pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

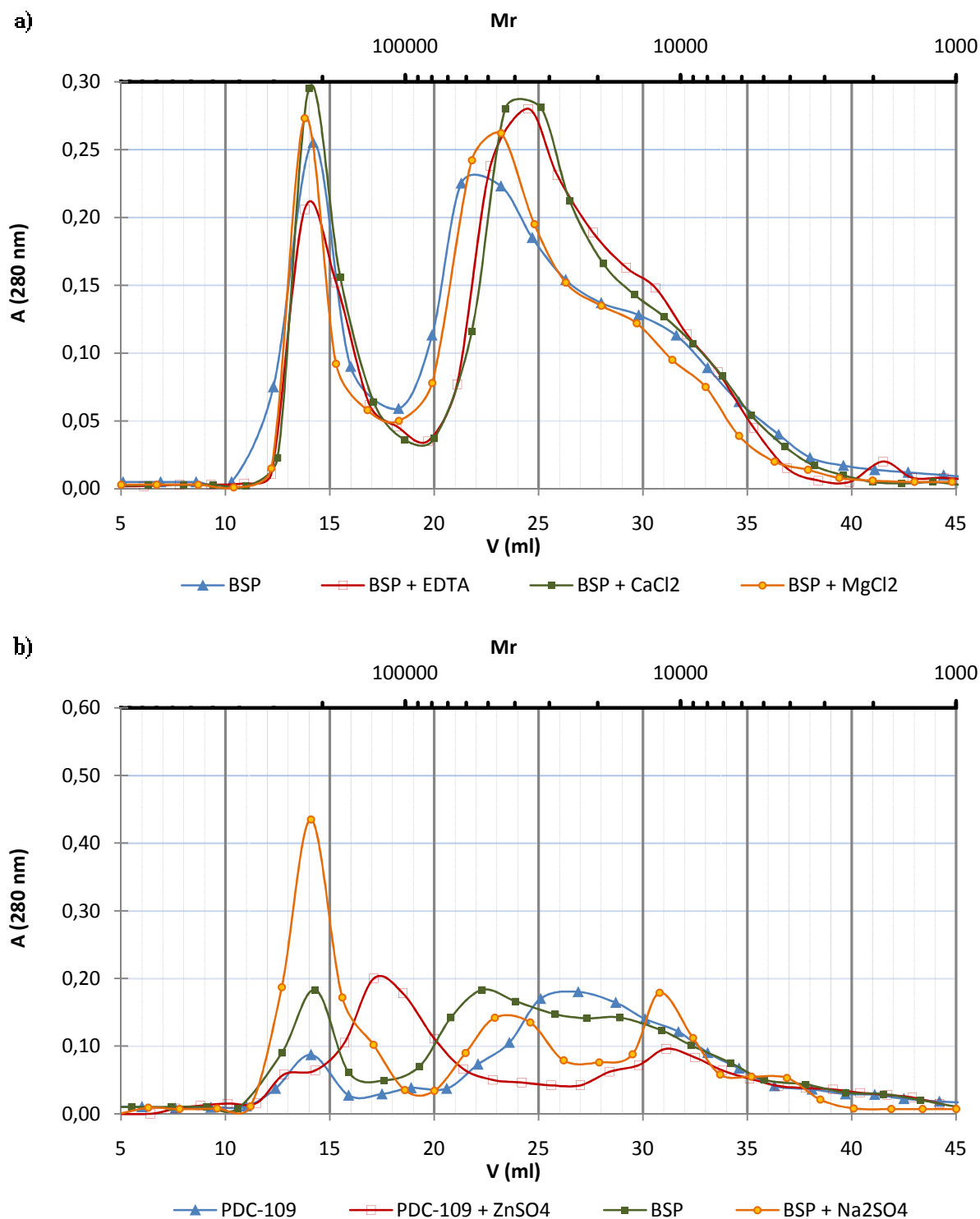
Vliv přítomnosti dvojmocných kationtů je zobrazen na obr. 3.9 – 3.11 (str. 49 – 51). V přítomnosti EDTA a citrátu (obr. 3.9, str. 49) je v případě PDC-109 rovnováha monomer/dimer značně posunuta ve prospěch monomeru (viz kap. 3.2, str. 43).

To je v souladu s předchozími studiemi [50], nicméně na rozdíl od našeho experimentu se tam uvádí, že v přítomnosti EDTA se PDC-109 vyskytuje pouze ve formě monomeru, což může být dáno vyšší konc. EDTA v jejich experimentech (50mM [50]).

Zároveň v přítomnosti Mg^{2+} a Mn^{2+} se efekt EDTA neprojeví (obr. 3.10), což naznačuje možnou aktivní roli dvojmocných kationtů při formaci dimerů (EDTA a citrát mají na tyto kationty chelatační účinky). V přítomnosti Ca^{2+} se však PDC-109 vyskytuje pouze ve formě monomeru (obr. 3.9, str. 49), což je opět v souladu s [50]. Zjevný rozpor mezi efektem Ca^{2+} a případnou participací dvojmocných kationtů je možné vysvětlit různou koncentrací iontů (výrazně vyšší koncentrace Ca^{2+}). Pík v oblasti 40 ml bude diskutován v kap. 3.5 na str. 61. Podobné tendence jsou patrné i u BSP (EDTA a Ca^{2+} posunují rovnováhu směrem k monomeru, Mg^{2+} na tuto rovnováhu nemá vliv) – obr. 3.11a.



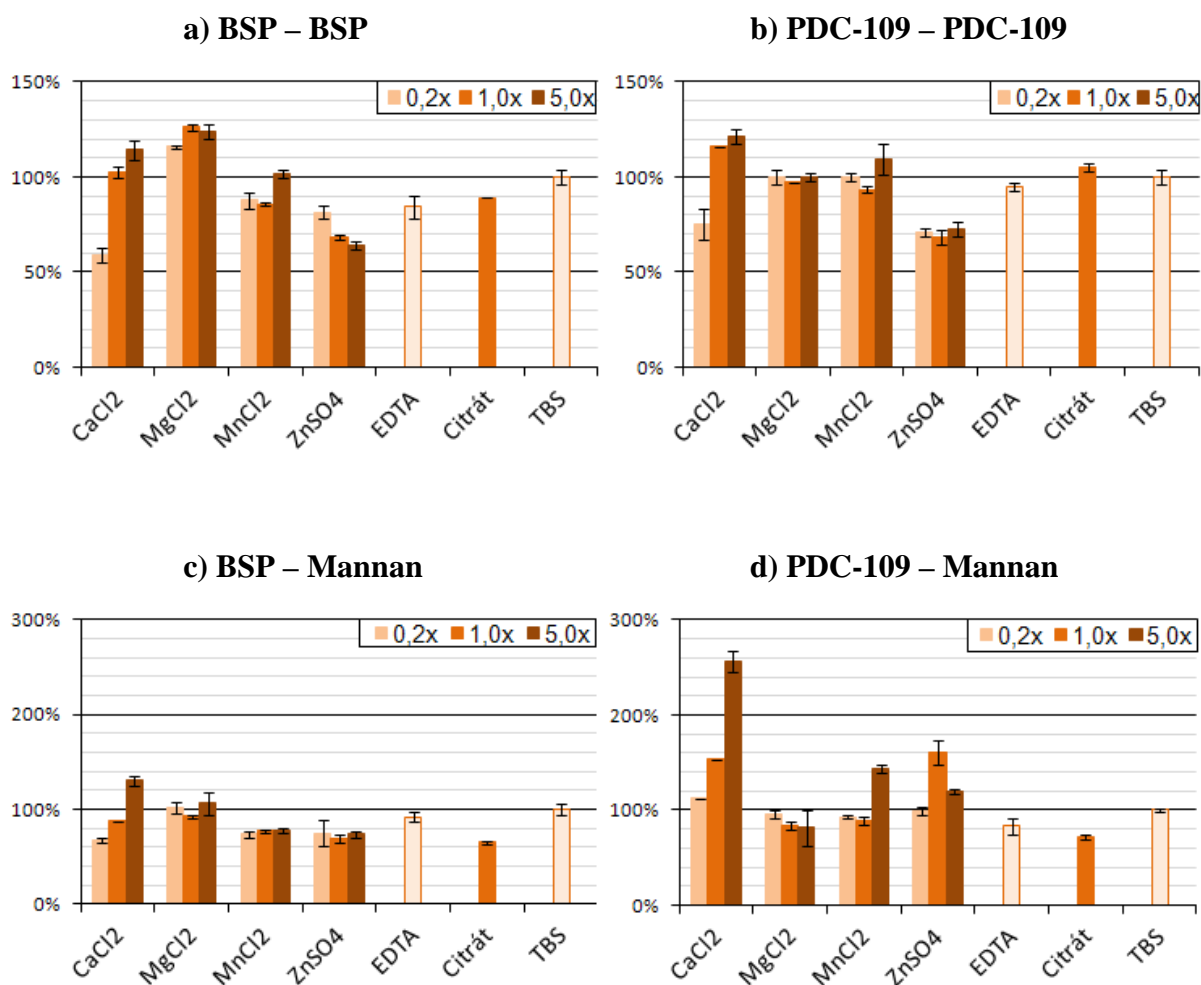
Obr. 3.10: Gelová chromatografie PDC-109 v přítomnosti EDTA, $MgCl_2$, $MnCl_2$; vzorky (2,5 mg) byly naneseny v TBS pH 7, obs. 1mM EDTA, resp. 4,3mM $MgCl_2$ + 1mM EDTA, resp. 0,4mM $MnCl_2$ + 0,2mM EDTA, na kolonu ekvilibrovanou stejným roztokem. Jako kontrola je zobrazen chromatograf BSP v TBS pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.



Obr. 3.11: Gelová chromatografie a) BSP v přítomnosti EDTA, CaCl₂ a MgCl₂ b) PDC-109 v přítomnosti ZnSO₄ a BSP v přítomnosti Na₂SO₄; vzorky (2,5 mg) byly naneseny v TBS pH 7, obs. 1mM EDTA, resp. 11mM CaCl₂ + 1mM EDTA, resp. 4,3mM MgCl₂ + 1mM EDTA, resp. 0,6mM ZnSO₄ + 0,3mM EDTA, resp. 0,3mM Na₂SO₄ na kolonu ekvilibrovanou stejným roztokem. Jako kontrola je zobrazen chromatograf BSP, resp. PDC-109, v TBS pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

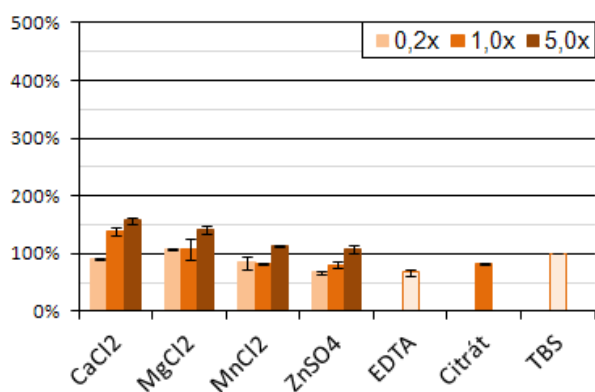
Pro sledování vlivu Zn^{2+} byl použit ZnSO_4 , nicméně jeho výrazný efekt se zdá být spíše důsledek přítomnosti síranových aniontů, neboť proteiny BSP se v přítomnosti Na_2SO_4 na gelové chromatografii chovaly podobně (obr. 3.11b, str. 51).

Ke sledování vlivu přítomnosti iontů na interakce BSP a PDC-109 s vybranými biotinylovanými preparáty byla použita metoda ELBA (obr. 3.12a – j).

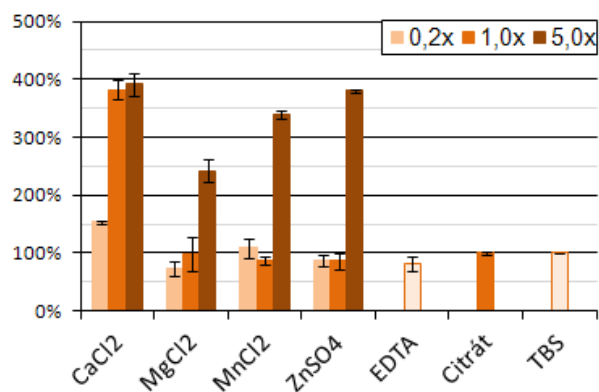


Obr. 3.12: Síla interakce BSP, resp. PDC-109 s biotinylovanými deriváty a) BSP b) PDC-109 c, d) mannanu e, f) heparinu g, h) látek z tekutin oviduktu i, j) fosforylcholinu; v přítomnosti vybraných nízkomolekulárních sloučenin; jako 100% byla zvolena příslušná interakce v TBS pH 7 (TBS). Hodnoty v legendě znamenají příslušný násobek koncentrace daných látek v TBS pH 7, tzn. 0,2x, 1,0x a 5,0x: 11mM CaCl_2 + 1mM EDTA (v tomto případě byl v koncentraci 5,0x použit 2x zředěný TBS kvůli korekci iontové síly), 4,3mM MgCl_2 + 1mM EDTA, 0,4mM MnCl_2 + 0,2mM EDTA, 0,6mM ZnSO_4 + 0,3mM EDTA, 1mM EDTA. Citrát = 30mM citronan trisodný ve 120mM NaCl. Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

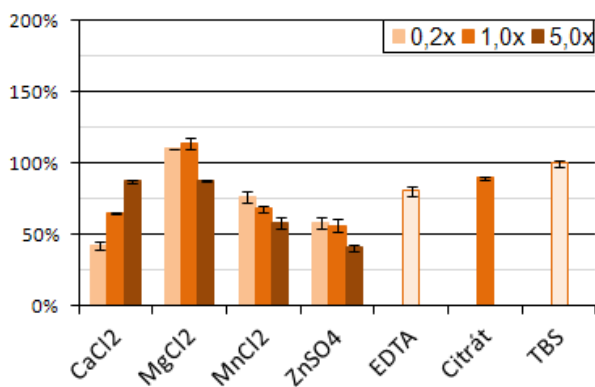
e) BSP – Heparin



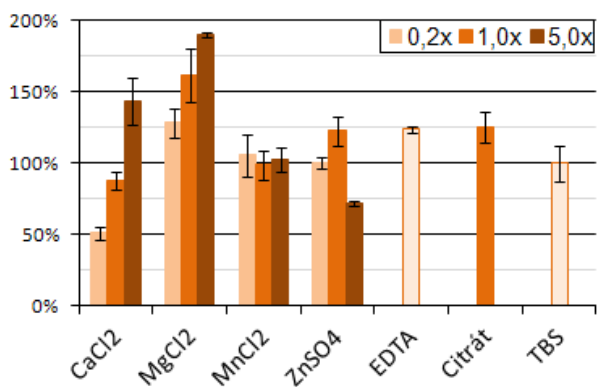
f) PDC-109 – Heparin



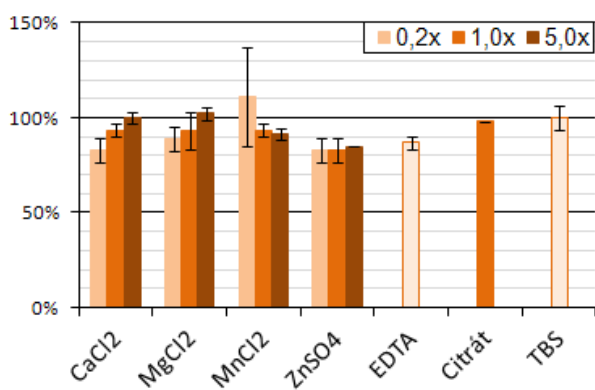
g) BSP – Tekutiny oviduktu



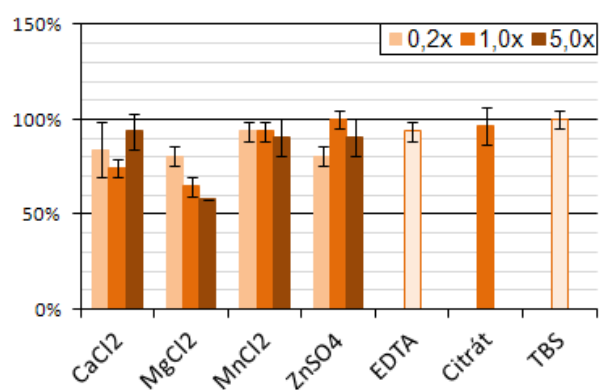
h) PDC-109 – Tek. oviduktu



i) BSP – Fosforylcholin



j) PDC-109 – Fosforylcholin



Pokračování obr 3.12 z předchozí strany

Interakce protein-protein (a, b) je podobná u obou vzorků. Je patrný inhibiční vliv ZnSO₄, což se dá vysvětlit zvýšenou agregací v jeho přítomnosti a oslabením formace dimerů (viz obr. 3.11b, str. 51) – případné agregáty, které takto vznikly, pak zřejmě

neochotně interagují s ukotveným proteinem. Naopak v přítomnosti ostatních látek, které upřednostňují spíše formaci dimerů až monomerů, je tato interakce vyrovnaná. Zajímavá je inhibice při nízké koncentraci Ca^{2+} .

Výrazná je interakce PDC-109 s mannanem při zvýšené koncentraci Ca^{2+} (obr. 3.12d, str. 53), kdy je PDC-109 výlučně ve formě monomeru. Zároveň je však velice silná při nízké iontové síle, kde je dimer posunut směrem k vyšším oligomerům (kap 3.3.3, str. 47), což může naznačovat interakci mannanu s PDC-109, která je nezávislá na jeho agregačním stavu.

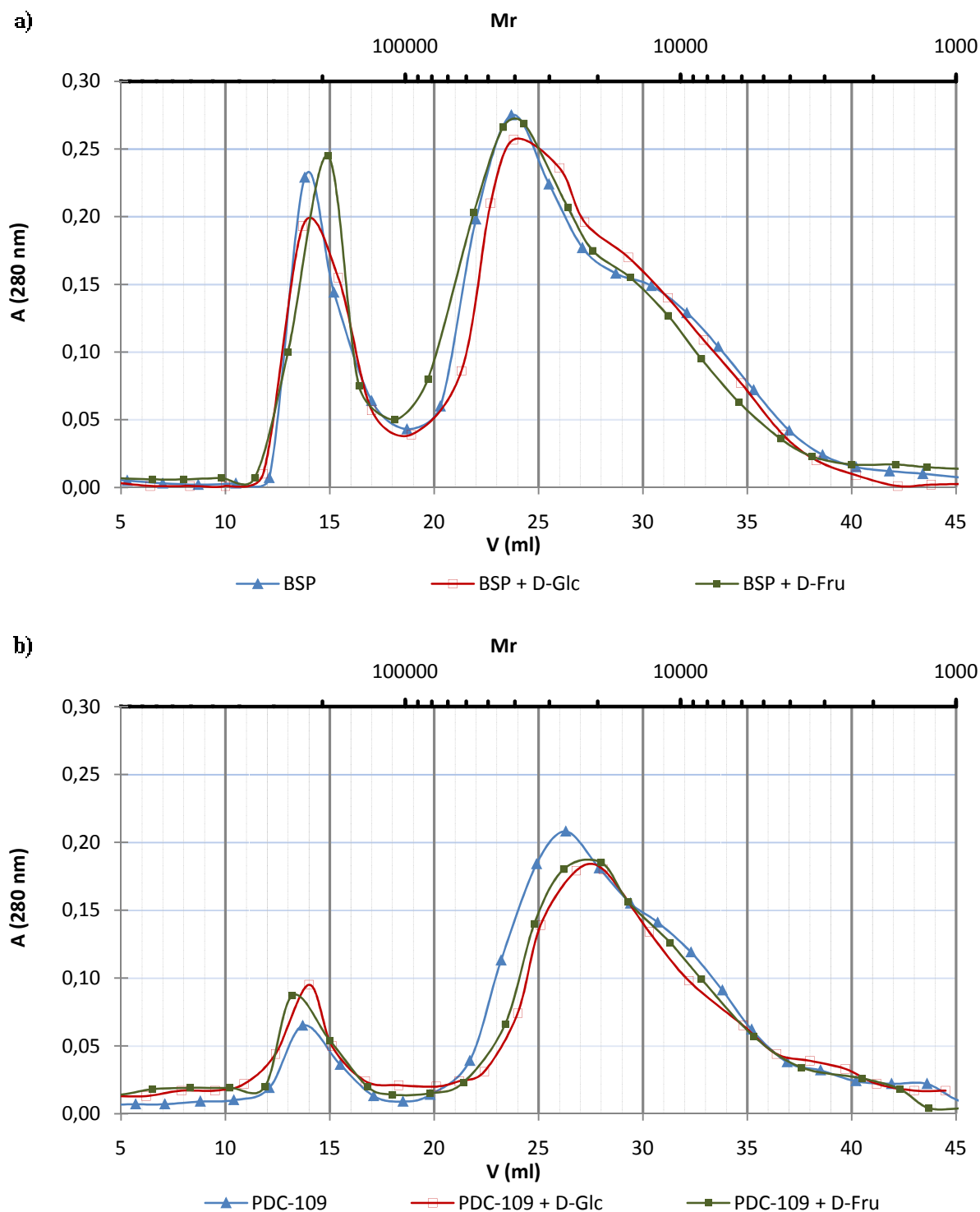
K velice výraznému posílení interakce dochází u PDC-109 s heparinem při vyšších koncentracích dvojmocných kationtů (obr. 3.12f, str. 53). V případě Ca^{2+} je tato interakce posílena již při střední koncentraci, která odpovídá vyšším koncentracím u ostatních iontů v našich experimentech (koncentrace látek byly určeny na základě fyziologických hodnot, viz kap. 2.2.2, str. 32). Vzhledem k protichůdným efektům Ca^{2+} a ZnSO_4 a nepříliš výrazným efektům Mg^{2+} a Mn^{2+} na agregaci PDC-109 (obr. 3.9 – 3.11, str. 49 - 51) se však zdá, že tento fakt s agregací nesouvisí, nicméně je možné, že při vyšších koncentracích mají i ostatní kationty podobný vliv na agregaci jako Ca^{2+} již při střední koncentraci. V takovém případě by to znamenalo, že interakce heparinu s PDC-109 může být favorizována ve formě monomeru, což by bylo též v souladu s výsledky studie [67], kde se jako heparin vázající frakce BSP na afinitní heparinové koloně ukázala být frakce v rozmezí M_r 10000 – 60000 [67].

Interakce PDC-109 a BSP s biotinylovaným derivátem lyofilizátu tekutin oviduktu (obr. 3.12g, h) je posílena v přítomnosti MgCl_2 . To může znamenat specifický vliv Mg^{2+} iontů na interakci s nějakou složkou oviduktálních tekutin. V případě PDC-109 je vidět podobná tendence jako u heparinu v přítomnosti Ca^{2+} a Mg^{2+} a může se jednat o nějaký glykosaminoglykan, které se v oviduktálních tekutinách vyskytují.

Interakce s fosforylcholinem (obr. 3.12i, j, str. 53) zřejmě není ovlivněna přítomností zkoumaných látek (pouze při vyšší koncentraci Mg^{2+} dochází k inhibici interakce s PDC-109), což též odpovídá jeho interakci, nezávislé na agregaci proteinu. Tato interakce spíše zřejmě způsobuje "rozpad" agregátů na dimery s navázaným fosforylcholinem.

Je zajímavé si povšimnout výrazně slabších interakcí, resp. míra jejich ovlivnění zkoumanými látkami u BSP v případě vzorků mannanu, heparinu a tekutin oviduktu. Tento fakt pravděpodobně ukazuje, že v těchto interakcích hraje klíčovou roli PDC-109, kterého je v purifikovaném vzorku více (stejná koncentrace obou vzorků).

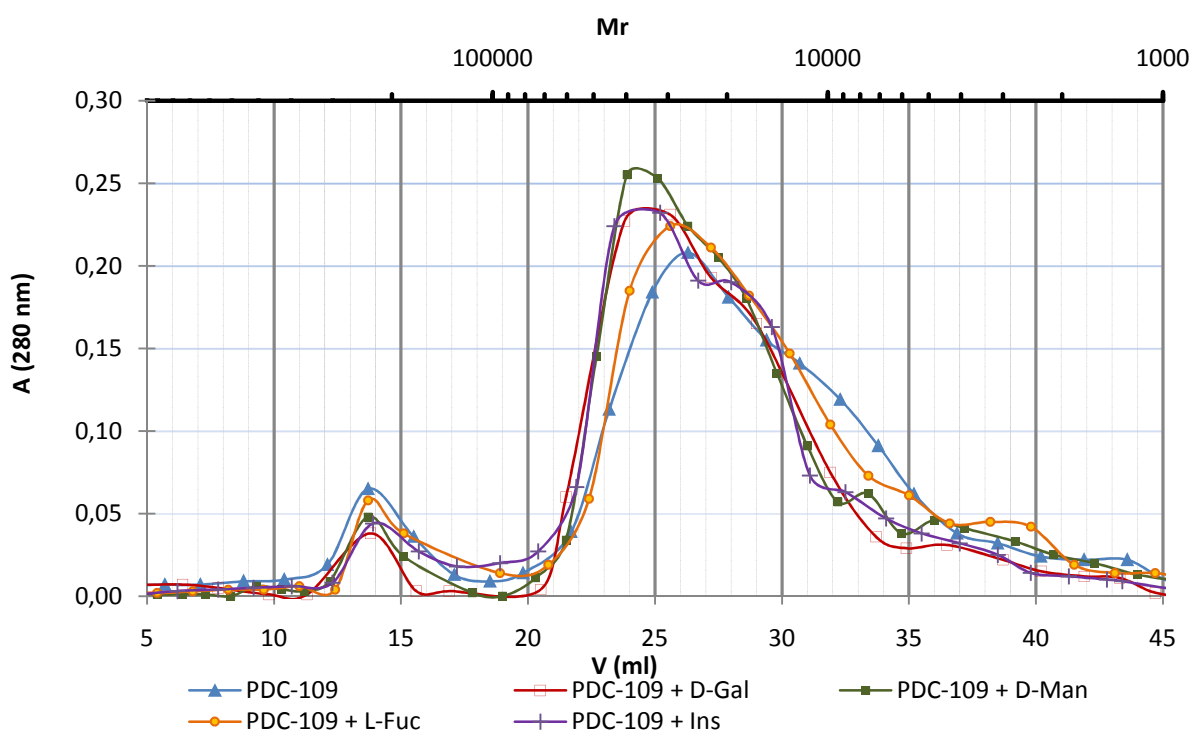
3.4.2 Vliv přítomnosti D-Glc, D-Fru, D-Gal, D-Man, L-Fuc a *myo*-Ins na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109



Obr. 3.13: Gelová chromatografie a) BSP b) PDC-109; v přítomnosti D-glukosy, resp. D-fruktosy; vzorky (2,5 mg) byly naneseny v PBS pH 7, obs. D-Glc (1,5 mg/ml), resp. D-Fru (5 mg/ml) na kolonu, ekvilibrovanou stejným roztokem. Kontrolní vzorek byl BSP, resp. PDC-109 v PBS pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

Na obr. 3.13 (str. 55) jsou zobrazeny chromatografy BSP a PDC-109 v přítomnosti D-glukosy a D-fruktosy. Zdá se, že při daných (fyziologických) koncentracích těchto cukrů se agregační profily proteinů nezmění. To je sice poněkud v rozporu s výsledky, uvedenými v [67], kde je deklarován disagregační účinek D-fruktosy, nicméně pouze na heparin vázající frakci BSP a při vyšší koncentraci fruktosy (2%; v našem experimentu pouze 0,5%).

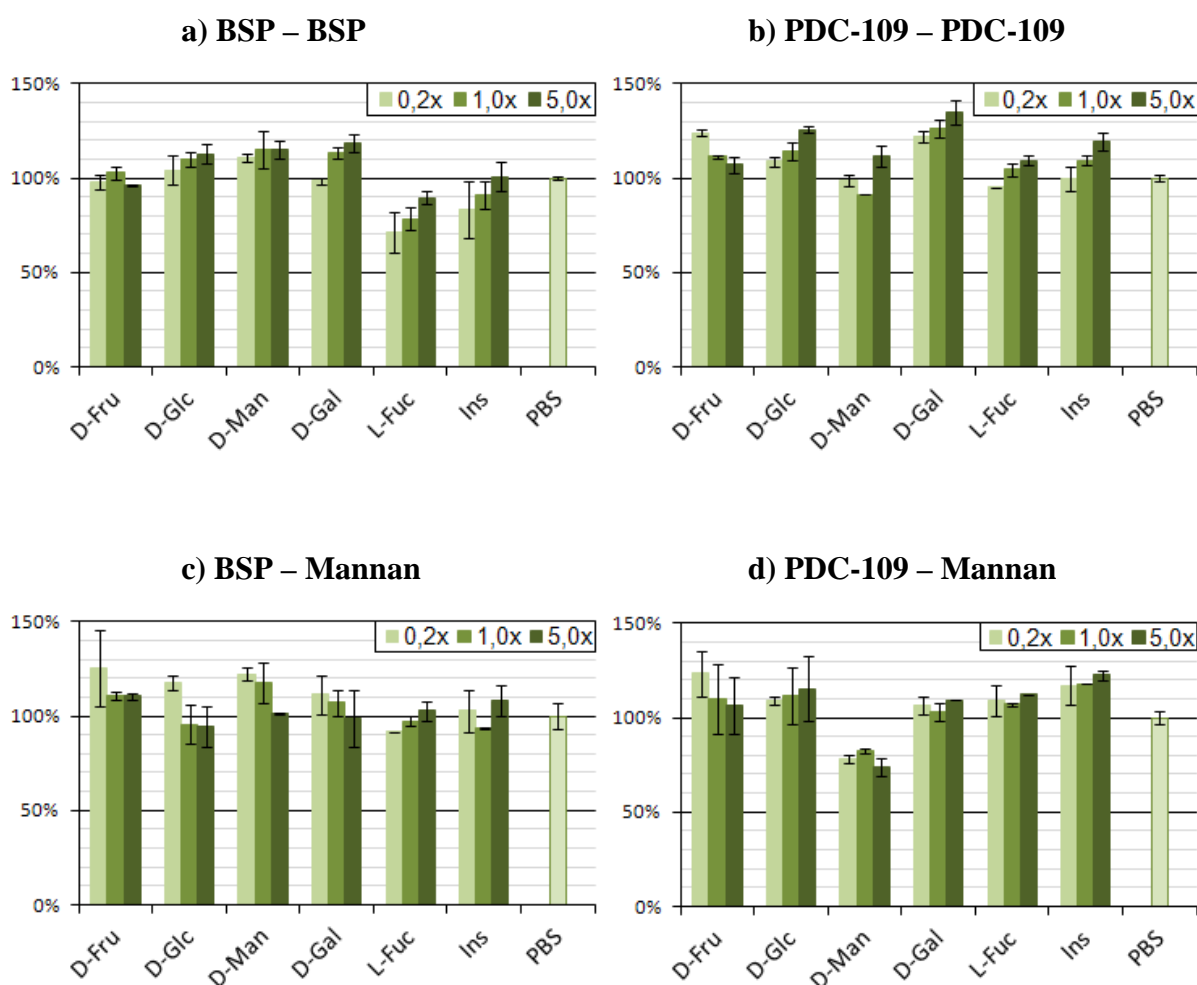
Vliv dalších sacharidů (D-galaktosa, D-mannosa, L-fukosa) a inositolu na agregaci PDC-109 je zřejmý z obr. 3.14. Ve všech případech, ačkoliv u L-fukosy méně zřetelně, dochází k posunu rovnováhy monomer/dimer směrem k dimeru.



Obr. 3.14: Gelová chromatografie PDC-109 v přítomnosti D-galaktosy, D-mannosy, L-fukosy a myo-inositolu; vzorky (2,5 mg) byly nanесeny v PBS pH 7, obs. zmíněné sloučeniny (v koncentraci 1 mg/ml, Ins 0,35 mg/ml), na kolonu ekvilibrovanou stejným roztokem. Jako kontrola je zobrazen chromatograf PDC-109 v PBS pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

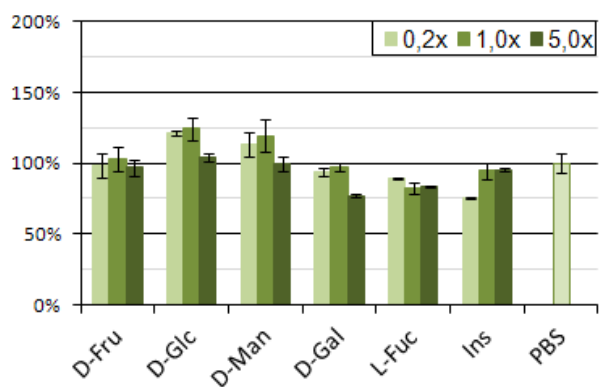
Ke sledování vlivu přítomnosti sacharidů na interakce s vybranými biotinylovanými preparáty byla použita metoda ELBA: obr. 3.15a – j (str. 57 - 58) Interakce protein-protein (a, b) není příliš ovlivněna, což odpovídá i výsledkům gelové chromatografie. Inhibiční vliv mannosy na interakci PDC-109 s mannanem (d) je

v souladu s [49] a potvrzuje afinitu PDC-109 k mannosylovým skupinám mannanu. Zajímavá je inhibice interakce PDC-109 s heparinem mannosou a galaktosou (f), která naznačuje, že vazebná místa pro heparin a mannan se mohou překrývat (mannosa inhibuje též vazbu na mannan). Zajímavým výsledkem je značná inhibice interakce PDC-109 s fosforylcholinem v přítomnosti vysoké koncentrace glukosy (j), nicméně zdali tento efekt souvisí s agregací, nemůžeme porovnáním s gelovou chromatografií posoudit, jelikož nastal až při pětinasobné koncentraci, než při které byl vliv glukosy zkoumán pomocí zmíněné metody.

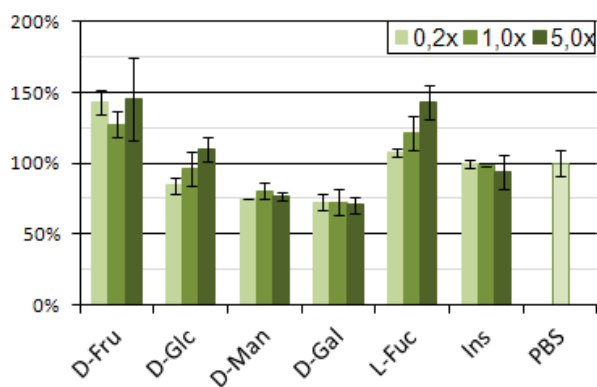


Obr. 3.15: Síla interakce BSP, resp. PDC-109 s biotinylovanými deriváty a) BSP b) PDC-109 c, d) mannanu e, f) heparinu g, h) látek z tekutin oviduktu i, j) fosforylcholinu; v přítomnosti vybraných jednoduchých cukrů a myo-inositolu; jako 100% byla zvolena příslušná interakce v PBS pH 7 (PBS). Hodnoty v legendě znamenají příslušný násobek koncentrace daných látek v PBS pH 7, tzn. 0,2x, 1,0x a 5,0x: D-fruktosa (5 mg/ml), D-glukosa (1,5 mg/ml), D-mannosa (1 mg/ml), D-galaktosa (1 mg/ml), myo-inositol (0,35 mg/ml). Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

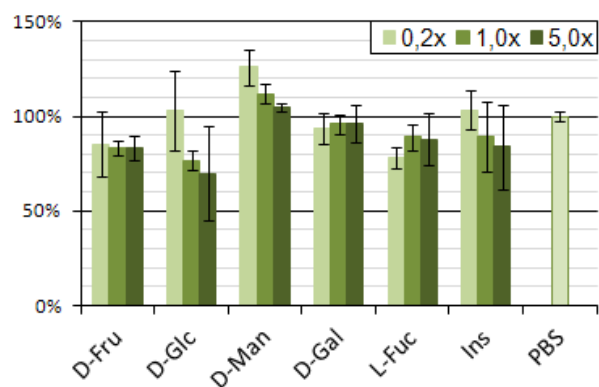
e) BSP – Heparin



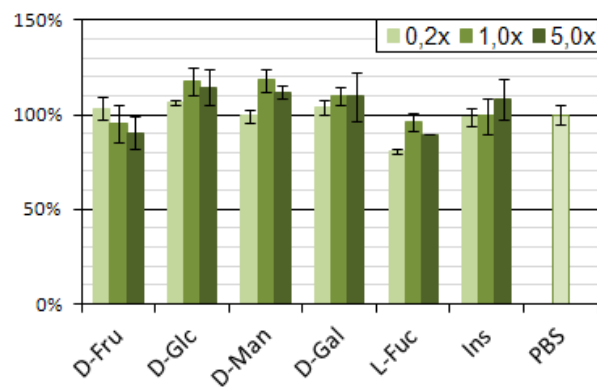
f) PDC-109 – Heparin



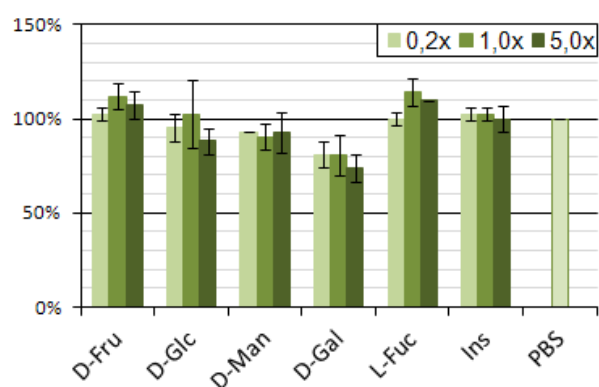
g) BSP – Tekutiny oviduktu



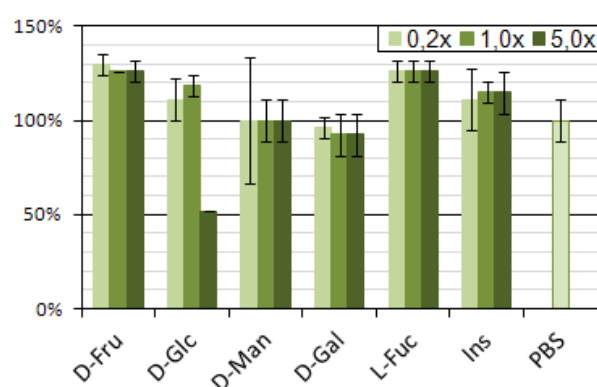
h) PDC-109 – Tek. oviduktu



i) BSP – Fosforylcholin



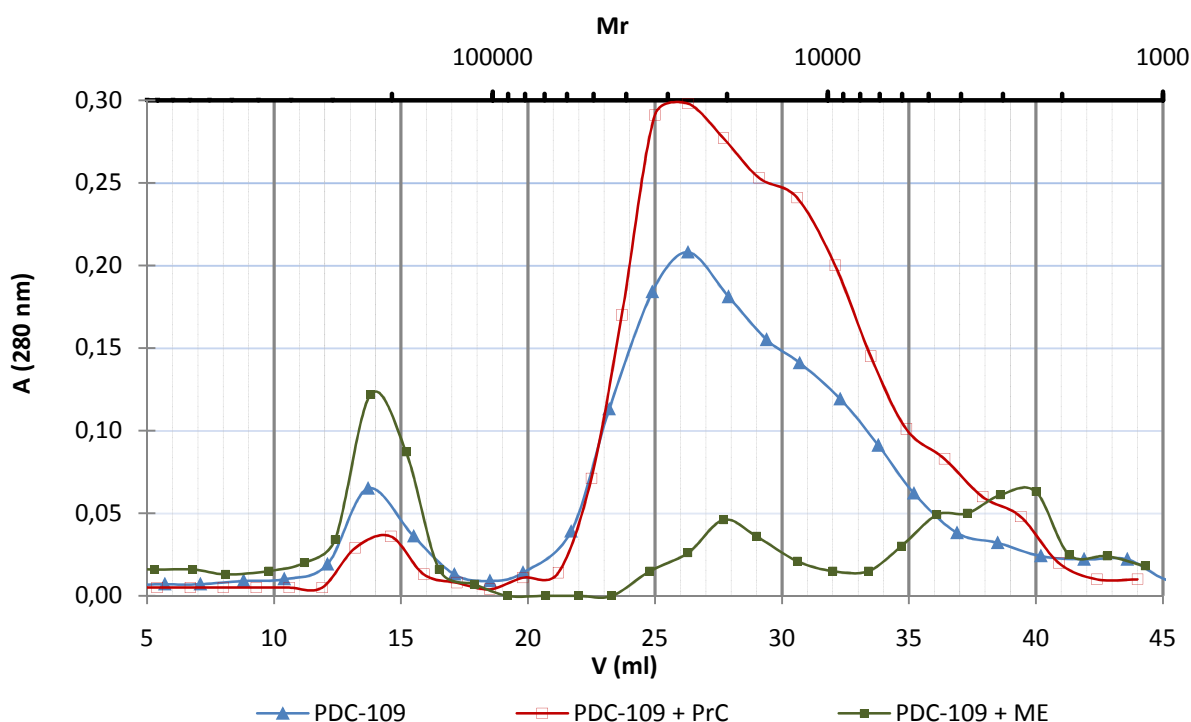
j) PDC-109 – Fosforylcholin



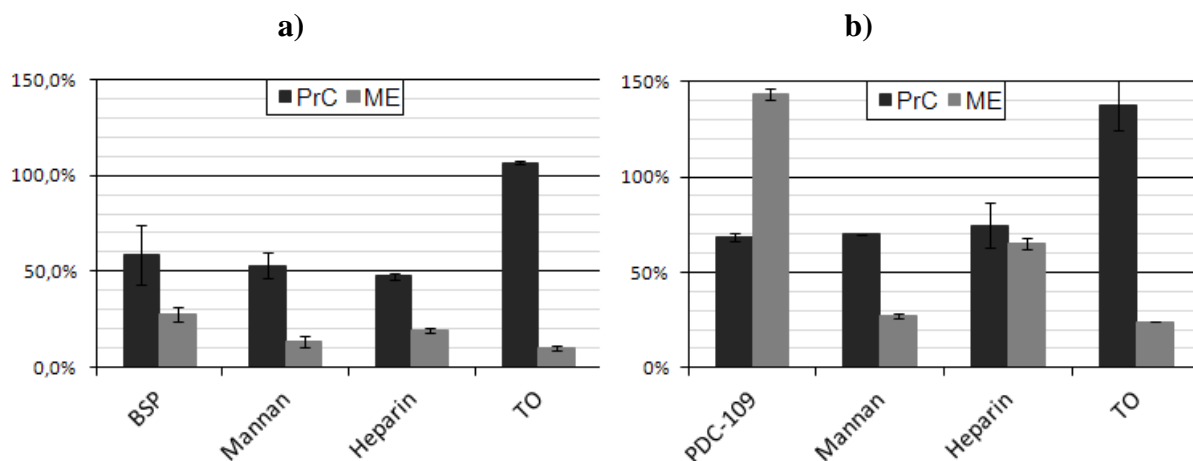
Pokračování obr 3.15 z předchozí strany

3.4.3 Vliv přítomnosti fosforylcholinu a merkaptoethanolu na agregaci a vazebné vlastnosti BSP a PDC-109

Na obr. 3.16 jsou znázorněny chromatografy v přítomnosti fosforylcholinu a merkaptoethanolu. Evidentně vyšší koncentrace proteinu v případě fosforylcholinu je pravděpodobně způsobena lepší rozpustností našeho purifikovaného PDC-109 v přítomnosti této sloučeniny (srovnej kap 3.2 na str. 43). Ve srovnání s kontrolním vzorkem (PDC-109) je zřejmá změna v distribuci proteinu do jednotlivých píků, zejména značný pokles píku I. To je ve shodě s výsledky uvedenými v [50] a potvrzuje to pozorování, že PDC-109 se k fosforylcholinu a potažmo k fosfocholinovým lipidům na membráně spermie váže ve formě dimeru [42,54]. Naopak v prostředí 1% merkaptoethanolu je znát nárůst vysokomolekulární frakce, což pravděpodobně souvisí s nespecifickou agregací po redukcí intramolekulárních disulfidických můstků, které jsou nativně v PDC-109 přítomny [29,40].



Obr. 3.16: Gelová chromatografie PDC-109 v přítomnosti fosforylcholinu (PrC) a merkaptoethanolu (ME); vzorky (2,5 mg) byly nanесeny v TBS pH 7 (PrC), resp. v PBS pH 7 (ME) obs. 10 mM fosforylcholin, resp. 1% 2-merkaptoethanol; na kolonu ekvilibrovanou TBS pH 7, resp. PBS pH 7. Jako kontrola je zobrazen chromatograf PDC-109 v PBS pH 7. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.



Obr. 3.17: Síla interakce a) BSP b) PDC-109; s biotinylovanými deriváty vybraných vzorků v přítomnosti fosforylcholinu (PrC), resp. Merkптоethanolu (ME); jako 100% byla zvolena příslušná interakce v TBS pH 7 pro PrC a PBS pro ME. Koncentrace PrC byla 10 mM, resp. 1% ME. (TO = látky z tekutin oviduktu, PrC = fosforylcholin). Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

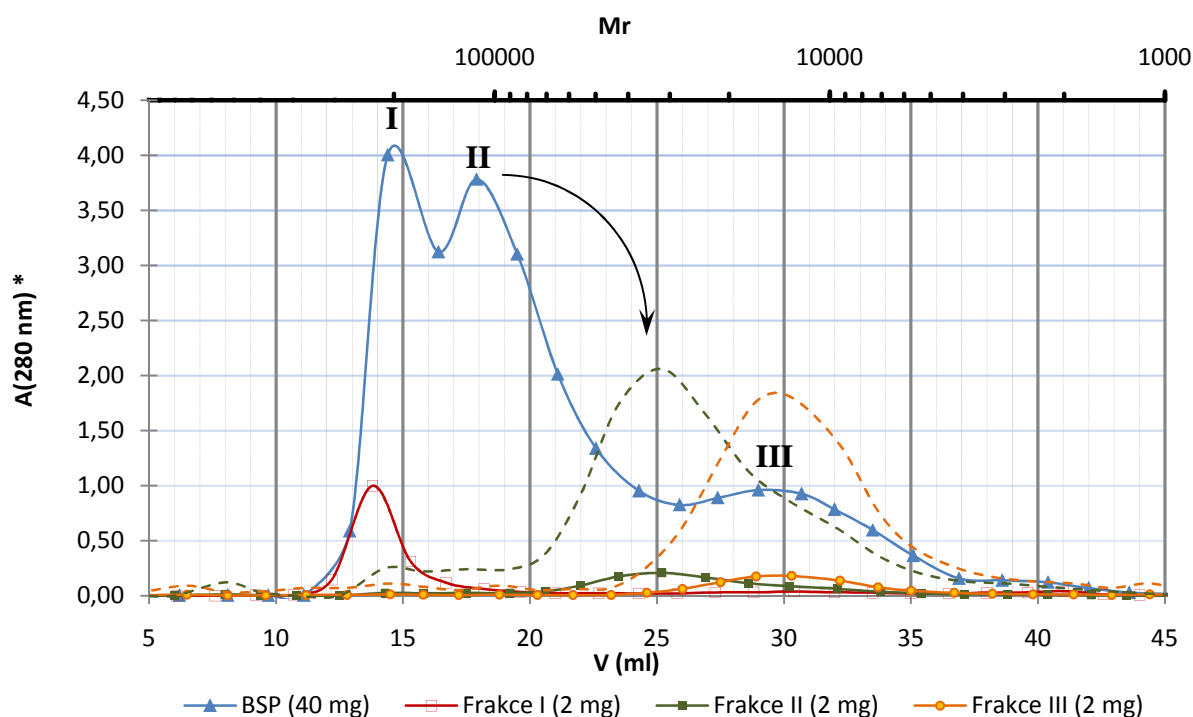
Výsledky studia vazebných vlastností BSP a PDC-109 v přítomnosti těchto látek jsou znázorněny na obr. 3.17. V přítomnosti fosforylcholinu dochází ke značné inhibici všech interakcí vyjma interakce s látkami tekutin oviduktu. To odpovídá modelu, kdy PDC-109, navázaný ve formě dimeru na membránu spermie, interaguje s glykosaminoglykany oviduktálních tekutin, čímž indukuje kapacitaci [72,78]. Zároveň to odpovídá našim výsledkům, že je tato interakce vyšší v přítomnosti $MgCl_2$, který podporuje formaci dimerů (kap. 3.4.1, str. 49).

Merkптоethanol zřejmě proteiny denaturuje, neboť většina interakcí je v jeho přítomnosti minimální. Pouze interakce PDC-109 s PDC-109 je výrazně silnější, což odpovídá výsledkům gelové chromatografie a pravděpodobně nespecifické agregaci v důsledku denaturace a zdá se tedy, že S-S můstky, resp. jejich modulace (redukce/oxidace) nesouvisí s polydisperzitou PDC-109.

3.5 Analýza separovaných frakcí BSP a PDC-109

Pro účely analýzy jednotlivých frakcí BSP a PDC-109 (viz kap. 3.2, str. 43) byla provedena 5x gelová chromatografie BSP (40 mg). Spojené eluáty v maximech jednotlivých píků (viz obr. 3.18) byly jednak dále analyzovány, jednak z nich byl izolován PDC-109. Značený PDC-109 (25 mg) byl rovněž rozdělen a jednotlivé frakce použity pro studium vazby na membránu spermie.

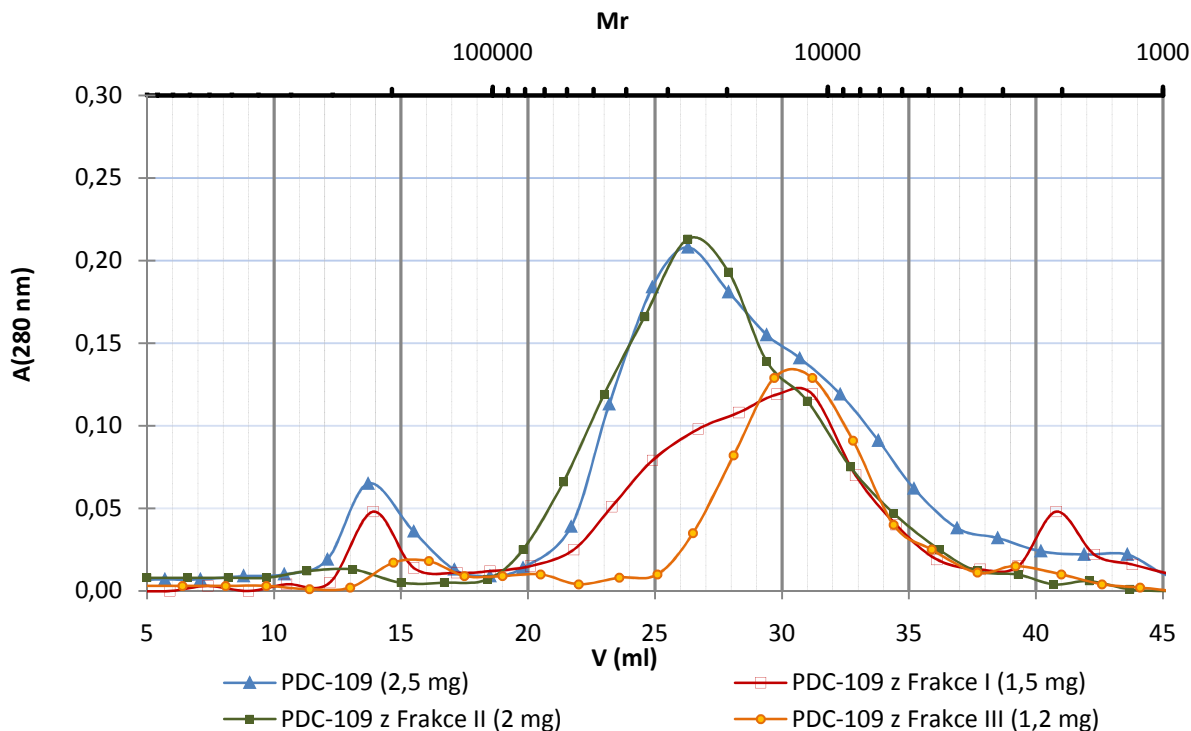
Na obr. 3.18 jsou zobrazeny chromatografy jednotlivých frakcí BSP (odp. píkům I, II a III) po jejich opětovném nanesení na kolonu ve srovnání s chromatografem původního vzorku, ze kterého byly získány. Frakce I a II jsou eluovány při objemech, které odpovídají původnímu vzorku. Frakce II se posouvá z oblasti M_r okolo 100000 do oblasti M_r okolo 30000, což je ve shodě s naším pozorováním vlivu koncentrace na agregaci BSP a PDC-109 (kap. 3.3.1, str. 44).



Obr. 3.18: Gelová chromatografie BSP a následně separovaných frakcí; 40 mg BSP bylo rozděleno - označeno jako BSP (40 mg) - a získané frakce (I, II, III) byly v množství 2 mg naneseny na kolonu. Vzorky byly nanášeny v PBS pH 7. Pro zviditelnění průběhu elucí frakcí II a III jsou zobrazeny též jejich 10x zvětšené obrazy (přerušované křivky odpovídající barvy). Šipka ukazuje posun v eluci frakce II. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

* Pro korekci nelinearity závislosti A na konc. byly při $A > 1$ frakce proměřeny zředěné a naměřená hodnota zpětně vynásobena zředovacím faktorem.

Na obr. 3.19 jsou eluční profily PDC-109, purifikovaného z jednotlivých frakcí (obr. 3.18, str. 61). Podobně jako u vzorku kompletních proteinů semenné plazmy si PDC-109 z jednotlivých frakcí do jisté míry udržuje svůj agregační stav a to i po purifikaci (nicméně je zřejmá jistá redistribuce frakce I do ostatních frakcí).

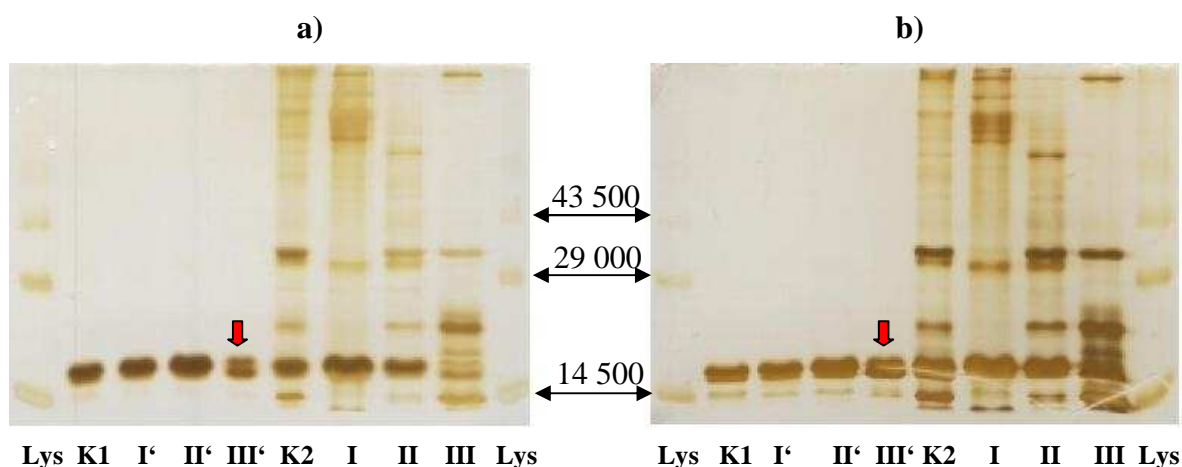


Obr. 3.19: Gelová chromatografie PDC-109 purifikovaného z frakcí I, II a III po separaci BSP gelovou chromatografií; vzorky byly v uvedeném množství naneseny na kolonu v PBS pH 7, ekvilibrovanou stejným pufrem. Jako kontrola je zobrazen chromatograf PDC-109 v PBS. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

To nás vedlo k myšlence, zdali se jednotlivé frakce neliší v zastoupení glykoform, jelikož je nám z literatury známo, že se PDC-109 vyskytuje v glykosylované a neglykosylované formě [34]. Frakce byly proto analyzovány SDS elektroforézou a následně barveny stříbrem s detekcí na proteiny a glykoproteiny. Výsledné elektroforeogramy jsou zobrazeny na obr. 3.20 na str. 63. Je viditelný rozdíl v zastoupení glykoform PDC-109, reprezentovaných dubletem [70] ve frakcích I' – III' (PDC-109 z BSP frakcí I – III). Zatímco ve frakci I' a II' a v nerozděleném PDC-109 je dominantní vrchní část dubletu (odpovídající zřejmě majoritní glykosylované formě s vyšší M_r), u frakce III' je tomu naopak, což je velmi zřetelné též u BSP frakce III (3.20b – dráha III). Fakt, že se domnělá neglykosylovaná forma objevuje po detekci glykoproteinů, je zřejmě

důsledek příliš vysoké koncentrace, nanesené na gel. Je též možné, že se jedná o částečně glykosylovanou formu. Stopa, která se objevila pod dublety (3.20b – dráhy K1, I, II a III) znamená přítomnost dalšího proteinu v purifikovaném vzorku. Pravděpodobně se jedná o aSFP, který nebyl v našem experimentu separován ještě před nanesením BSP na afinitní kolonu (jelikož jsme ho nepotřebovali pro naše experimenty) a může se teoreticky kopurifikovat s PDC-109. Další možné vysvětlení je, že se jedná o produkt proteolýzy PDC-109 (viz dále).

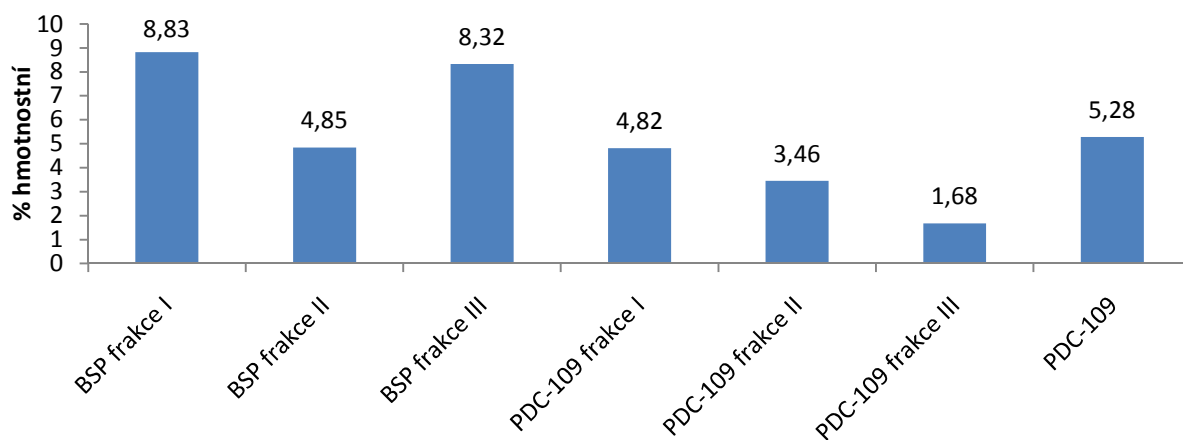
Dráhy I – III dále odkrývají zastoupení jednotlivých proteinů v BSP. Vyplývá z nich, že PDC-109 se vyskytuje ve všech frakcích, což je zřejmé též s analýzy drah I' – III'. Dráha I obsahuje vysokomolekulární proteiny, v drahách II a III se vyskytuje protein o M_r okolo 30000 a jedná se zřejmě o BSP-30-kDa. Výrazná stopa v oblasti okolo 20000 v dráze III patří zřejmě BSP-A3 a stopa okolo 14000 odpovídá aSFP. Poněkud záhadný je výskyt vysokomolekulární stopy v dráze III.



Obr. 3.20: SDS elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu BSP frakcí z gelové chromatografie (I – III) a PDC-109 purifikovaného z těchto frakcí (I' – III') a) barvení proteinů stříbrem b) barvení glykoproteinů stříbrem; šipky označují odlišný elektroforeogram dráhy III' oproti drahám K1, I' a II'. Jsou vyznačeny M_r použitých standardů. (Lys = kopolymer lysozymu, K1 = PDC-109, K2 = BSP)

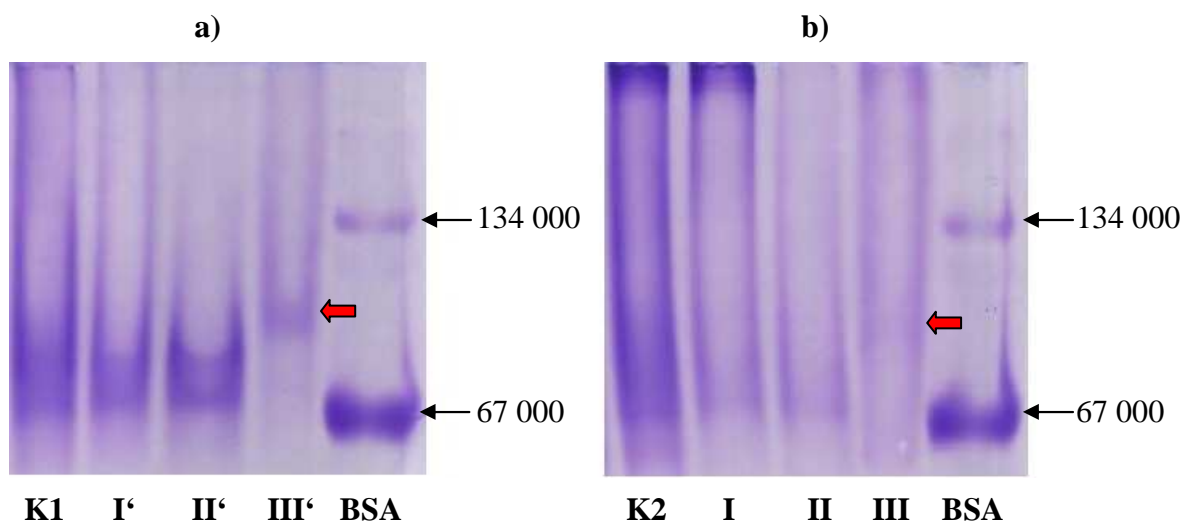
Pomocí metody stanovení obsahu neutrálních cukrů dle Duboise byly analyzovány jednotlivé frakce BSP a PDC-109. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena metodou Bradfordové a výsledné hodnoty z Duboise byly přepočteny na jednotkovou koncentraci (obr. 3.21). Ukázalo se, že PDC-109 z frakce III obsahuje nejméně neutrálních

cukrů, což dále podporuje naši myšlenku o rozdílném zastoupení glykoform v jednotlivých frakcích.



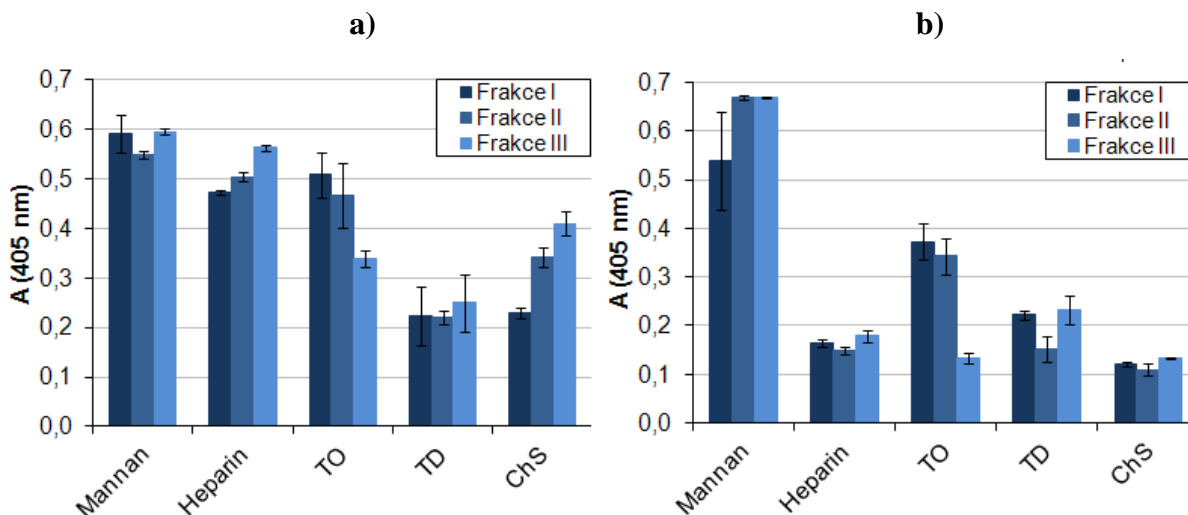
Obr. 3.21: Obsah neutrálních cukrů frakcí BSP a PDC-109; PDC-109 – hodnota vypočtená ze známé hmotnosti glykosylované formy PDC-109 a její sacharidové části

Rozdílné chování frakce III bylo potvrzeno též výsledky nativní elektroforézy (obr. 3.22). Porovnáním se standardem (BSA) vykazuje frakce píku III paradoxně nejvyšší M_r . Nicméně tato metoda nedělí proteiny podle jejich M_r tak spolehlivě jako např. SDS-PAGE a chování každého proteinu je trochu odlišné [94-96].



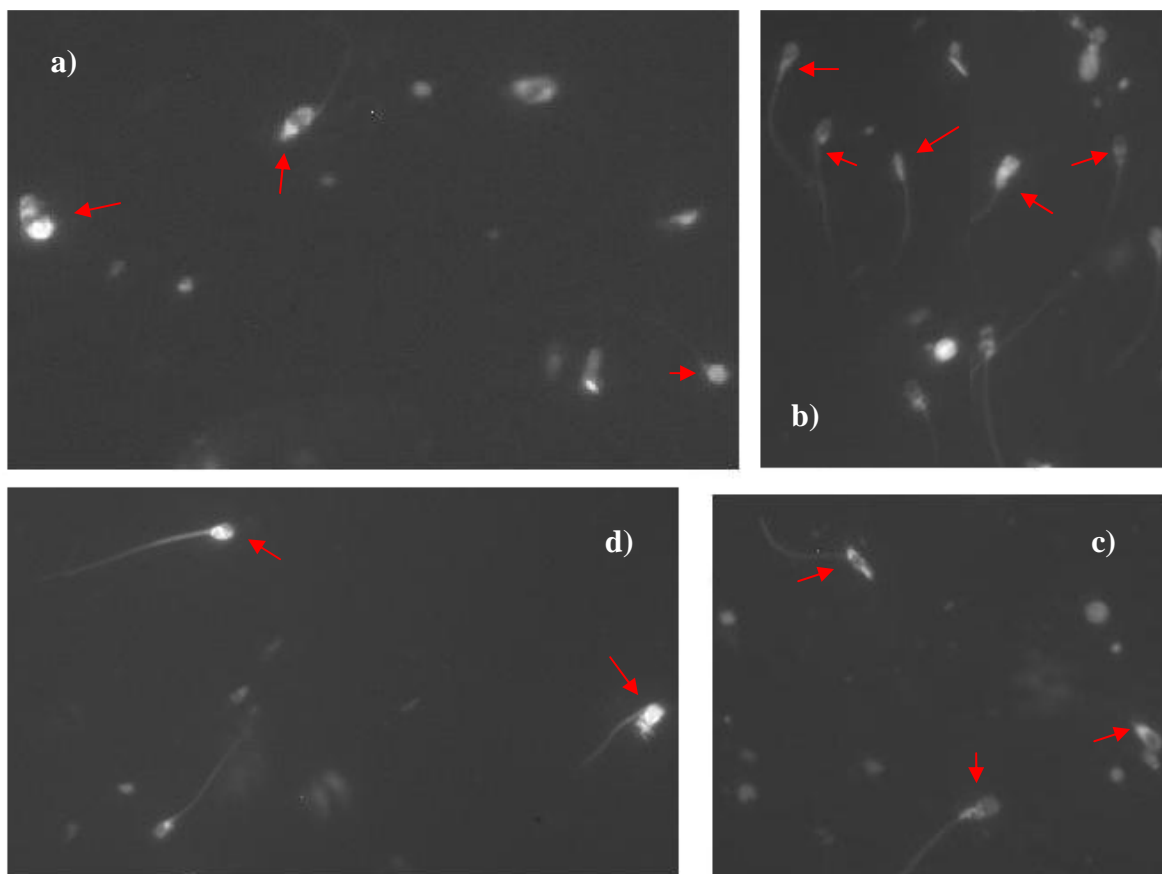
Obr. 3.22: RN elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu a) PDC-109 z BSP frakcí (I' – III') b) BSP frakcí (I – III); šipky označují odlišný elektroforeogram drah III' a III. Jsou vyznačeny M_r použitých standardů. (K1 = PDC-109, K2 = BSP, BSA = hovězí sérový albumin). Barveno pomocí CBB.

Metodou ELBA byly dále zkoumány rozdíly ve vazebných vlastnostech jednotlivých frakcí (obr. 3.23). Výrazný je pokles interakce s látkami tekutin oviduktu v obou případech u frakce III.



Obr. 3.23: Síla interakce jednotlivých frakcí a) BSP b) PDC-109; s biotinylovanými deriváty vybraných vzorků; (TO = látky tekutin oviduktu, TD = látky tekutin dělohy, ChS = chondroitin sulfát). Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

Pomocí fluorescenční mikroskopie byl zkoumán rozdíl v interakcích jednotlivých frakcí PDC-109 s membránou spermie: pro tyto účely bylo rozděleno 25 mg PDC-109 značených FITC na Sephadexu G-150 a jednotlivé frakce byly po příslušném zředění inkubovány s promytými ejakulovanými spermii býka. Výsledné snímky z fluorescenčního mikroskopu jsou na obr. 3.24 na str. 66. Na snímcích jsou vidět rozdílné preference jednotlivých frakcí k různým segmentům membrány spermie. Vysokomolekulární frakce (a) se váže na akrosomální a postakrosomální oblast, zatímco v ekvatoriálním segmentu se neváže. Podobně je tomu tak i u frakce monomeru (s nižším obsahem glykosylované formy) - (c). Frakce II (b), která se vyskytuje v rovnováze dimer/multimer v závislosti na koncentraci proteinu (viz kap. 3.3.1, str. 44), se váže spíše na postakrosomální oblast a krček. Nerozdělený PDC-109 (d) pokrývá celou membránu spermie přibližně rovnoměrně.

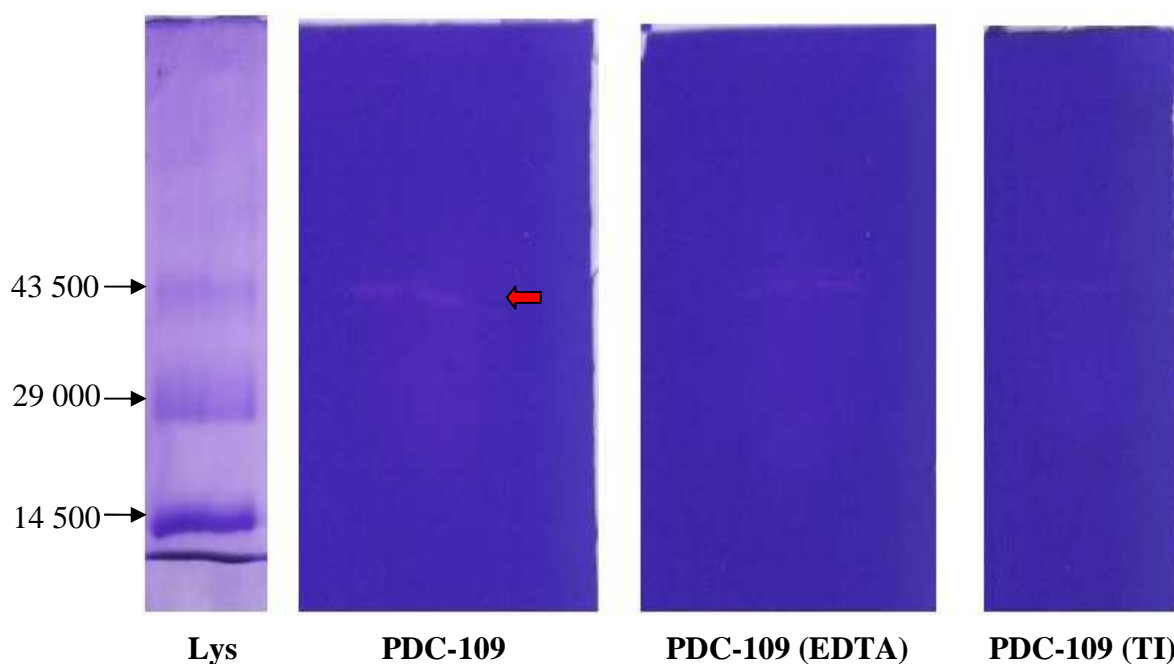


Obr. 3.24: *Fluorescenční mikroskopie: snímky spermií se navázanými značenými proteiny PDC-109 a) frakce I b) frakce II, c) frakce III, d) nerozdělené PDC-109; pro lepší orientaci jsou zobrazeny šipky u detailů, které jsou diskutovány v textu*

Kromě výše diskutovaných frakcí (I, II, III), byla v průběhu gelové chromatografie někdy eluována další frakce, a to při objemu okolo 40 ml, což odpovídá M_r asi 1500 (viz obr. 3.4b, 3.5b, 3.9, 3.19, 3.26 a 3.27, str. 45 - 69). Z počátku jsme mysleli, že se jedná o artefakt, který se zdržuje na koloně a při určitých podmínkách (změna pH, iontové síly, vysoká koncentrace CaCl_2 aj.) je eluován. Nicméně se objevoval vždy při stejném objemu (kolona byla před nanesením vzorku ekvilibrována daným roztokem), hlavně ve vzorcích PDC-109 a po 36 hodinách inkubace při 37 °C během enzymatické deglykosylace tvořil téměř třetinu vzorku (viz kap. 3.6, str. 68). Po vyloučení možnosti kontaminace vzorku (inkubace s přidavkem NaN_3) se jeví jako jediné vysvětlení přítomnost proteasy, která se zřejmě kopurifikuje s PDC-109 během afinitní chromatografie.

Byla proto provedena želatinová zymografie (obr. 3.25), která dokázala přítomnost proteasy, inhibované v přítomnosti trypsin inhibitoru (TI na obr. 3.25). Z výsledků se zdá,

že se jedná o serinovou proteasu, pravděpodobně akrosin (45 kDa, serinová proteasa trypsinového typu [11]), který se nachází v akrosomu, a je též přítomen v semenné plazmě z rozrušených buněk. Ve vzorcích BSP se neprojevuje, patrně v důsledku přítomnosti četných inhibitorů proteas. Navíc dochází zřejmě k jeho koncentraci během kopurifikace.

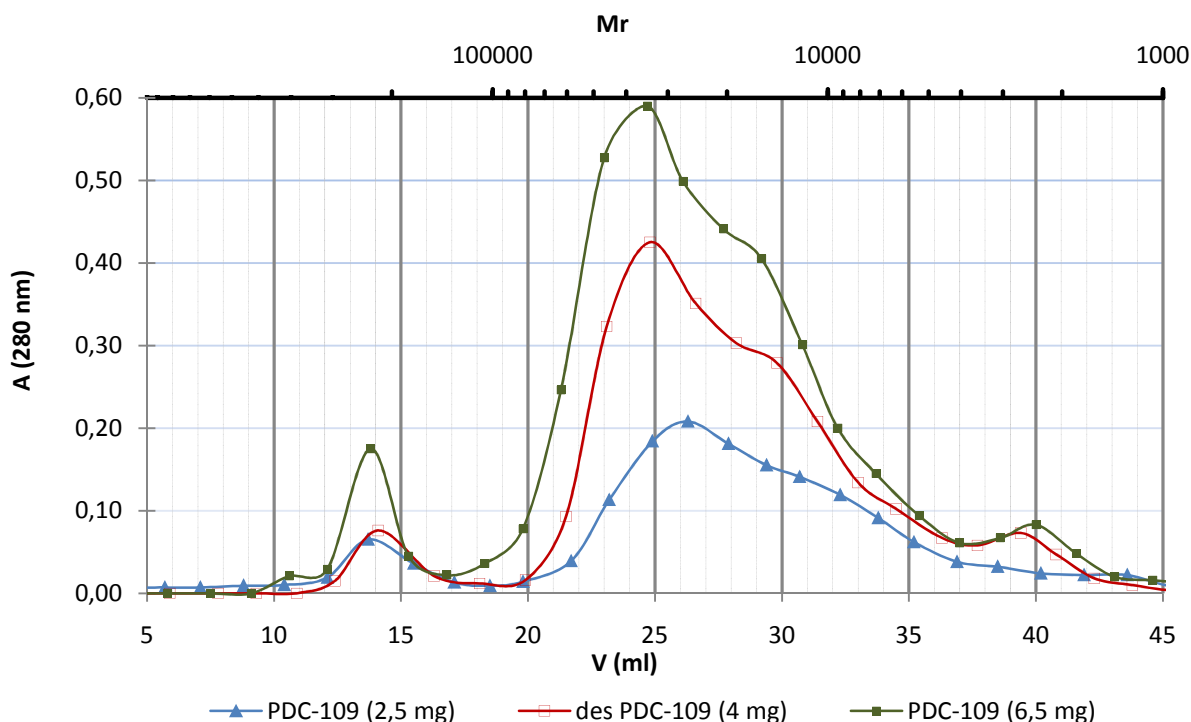


Obr. 3.25: Želatinová zymografie v 12% polyakrylamidovém gelu; (PDC-109 = gel inkubován v roztoku bez přidaného inhibitoru pro zjištění celkových proteas, EDTA = s přidavkem EDTA pro inhibici metaloproteas, TI = s přidavkem trypsin inhibitoru, Lys = kopolymer lysozymu), šipka ukazuje na místo proteolytické aktivity. Jsou vyznačeny molekulové hmotnosti použitého standardu (Lys) ve 12% gelu bez zapolymerované želatiny.

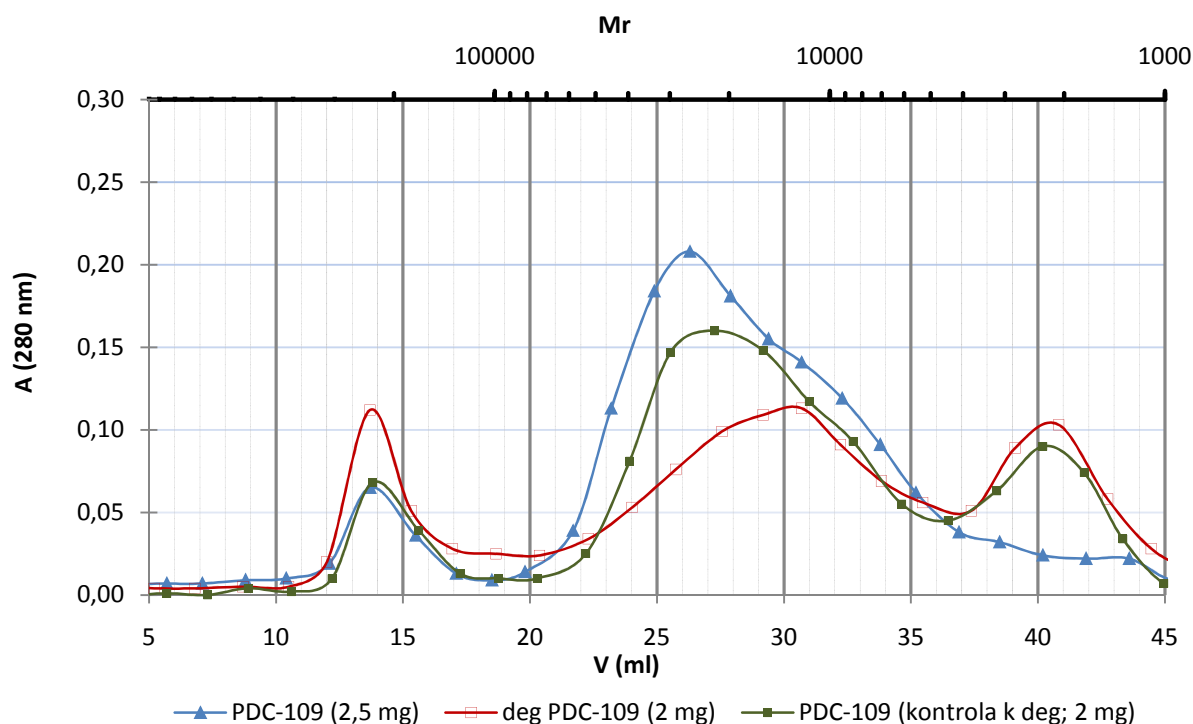
3.6 Vliv glykosylace PDC-109 na jeho agregaci

Abychom dále prozkoumali vliv rozdílného složení frakcí PDC-109 (kap. 3.5, str. 61), byla provedena parciální enzymatická deglykosylace pomocí neuraminidasy a dále pak sekvenční deglykosylace neuraminidasou, β -galaktosidasou a hexosaminidasou. Eluční profily takto modifikovaných preparátů jsou zobrazeny na obr. 3.26 a 3.27. Z obr. 3.26 je patrné, že u desializovaného PDC-109 je výrazně snížena vysokomolekulární frakce. Pro srovnání je zobrazen i chromatograf při nanesení 6,5 mg.

Zdá se však, že po celkové deglykosylaci (obr. 3.27, str. 69) je situace odlišná. Frakce I je výrazně posílena na úkor frakce II, nicméně není možné jednoznačně říci, zda je to důsledek deglykosylace nebo nízké koncentrace. Z porovnání s chromatografem na obr. 3.19 (str. 62) vyplývá zajímavá podobnost elučních profilů deglykosylovaného PDC-109 a PDC-109 purifikovaného z BSP frakce I. Vliv deglykosylace je patrný ze srovnání s kontrolním vzorkem bez přidaných glykosidas (obr. 3.27). Došlo k jasné změně v distribuci mezi frakcemi. Pík v oblasti okolo M_r 1500 je diskutován v kap. 3.5 na str. 61.



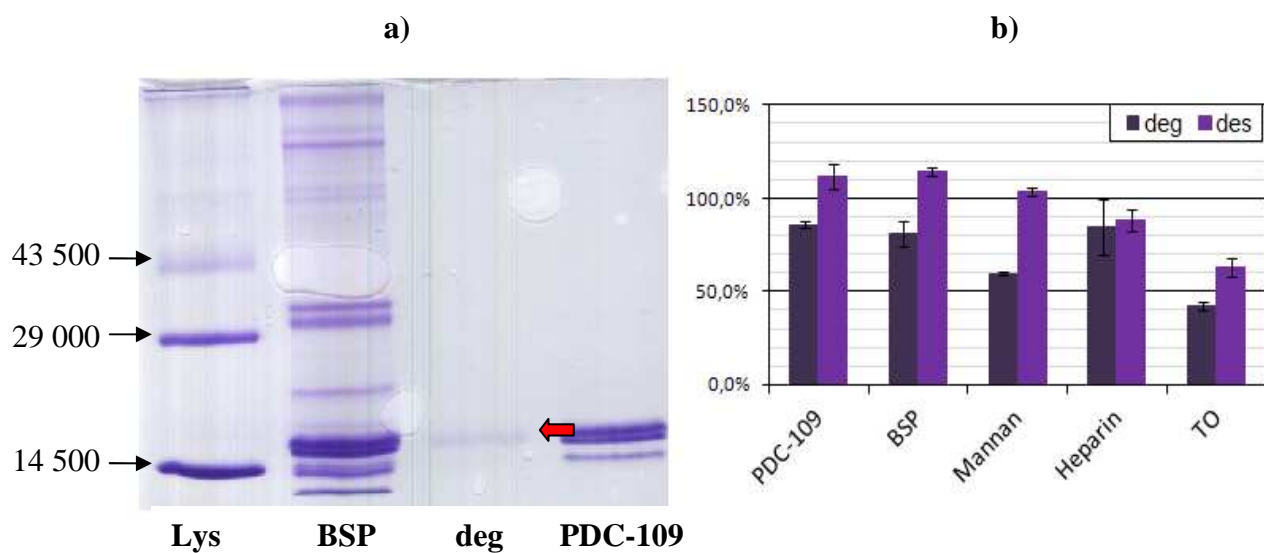
Obr. 3.26: Gelová chromatografie PDC-109 po inkubaci s neuraminidasou (des PDC-109); Vzorky byly v uvedeném množství naneseny na kolonu v PBS pH 7, ekvilibrovanou stejným pufrům. Jako kontrola jsou zobrazeny chromatografy PDC-109 (2,5 mg a 6,5 mg) v PBS. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.



Obr. 3.27: Gelová chromatografie PDC-109 po sekvenční deglykosylaci neuraminidasou -> β -galaktosidasou -> hexosaminidasou (deg PDC-109); Vzorky byly v uvedeném množství naneseny v reakčním pufru (10 mM MgCl_2 v PBS pH 7). Jako kontrola je zobrazen chromatograf PDC-109 v PBS (2,5 mg) a PDC-109 (2 mg) inkubovaný po dobu deglykosylace v reakčním pufru bez přítomnosti glykosidas. Absorbance byla měřena při 280 nm. Pro informaci o M_r je zobrazeno logaritmické měřítko, sestavené na základě dat z kalibrace kolony.

Na obr. 3.28a (str. 70) je výsledek SDS elektroforézy, kterou jsme ověřili úspěšnost deglykosylace. Protein byl analyzován až po proběhnutí gelové chromatografie, frakce s maximální absorbancí pak byly použity na SDS-elektroforézu, což vysvětluje nízký signál.

Výsledky měření vazebných interakcí deglykosylovaných preparátů metodou ELBA jsou zobrazeny na obr 3.28b: zatímco desializace nemá vyjma interakce s látkami tekutin oviduktu (TO) příliš vliv, celková deglykosylace inhibuje v různé míře všechny interakce, zejména s TO, což je v souladu s našimi výsledky pokusu s frakcemi PDC-109, kde se ukázalo, že frakce III, ve které převládá neglykosylovaná forma, rovněž vykazuje nejslabší afinitu k TO (kap. 3.5, str. 61).



Obr. 3.23: *a) ověření úspěšnosti deglykosylace PDC-109; šipka ukazuje na jediný singlet oproti dubletu ve vedlejší dráze, signalizující přítomnost pouze neglykosylovaného preparátu (Lys = kopolymer lysozymu, deg = PDC-109 po sekvenční deglykosylaci)*
b) Síla interakce jednotlivých deglykosylovaných preparátů s biotinylovanými deriváty vybraných vzorků; jako 100% je zvolena příslušná interakce nativního PDC-109 v PBS; (TO = látky tekutin oviduktu). Pro statistické účely jsou zobrazeny \pm směrodatné odchylky.

4. Diskuze

Z literární rešerše se dozvídáme, že proteiny býčí semenné plazmy, především čtyři majoritně zastoupené složky BSP-A1, A2 (různé glykoformy o stejné aminokyselinové sekvenci; jejich směs je označována jako PDC-109 [28,29,34]), A3 a 30 kDA [37,39], hrají podstatnou úlohu v procesu fertilizace, a to na několika úrovních: jednak fungují jako dekapacitační faktor, jednak kapacitaci za určitých podmínek indukují [57-60]. Vážou se na membránu spermie interakcí s fosfocholinovými lipidy, kde stimulují lipidový eflux [51,59,60]. Zprostředkovávají klíčovou vazbu na epitel oviduktu [43,48,70] a indukují kapacitaci interakcí s látkami oviduktálních a folikulárních tekutin [72,74,75,78,80].

BSP proteiny se nativně vyskytují v agregovaných formách a je za to zřejmě zodpovědný PDC-109 [28]. Nicméně o biologické funkci agregace není mnoho známo. Proto jsme se rozhodli detailně prozkoumat vliv řady faktorů na agregaci kompletních proteinů býčí semenné plazmy (BSP) a PDC-109 a zjistit, jakým způsobem může agregace nativně ovlivňovat jejich funkci.

Při experimentech s různou koncentrací proteinů se ukázalo, že se vyskytují v polydisperzním stavu, kdy je část ve formě monomerů, část ve formě vysokomolekulárních agregátů ($M_r > 150000$) a část je v dynamické rovnováze dimer/multimer, která je značně ovlivněna právě koncentrací proteinů (kap. 3.3.1, str. 44). To je zajímavé zjištění vzhledem k vysokým nativním koncentracím proteinů v semenné plazmě [35], kdy jsou takřka výhradně ve formě multimerních agregátů. Efekt jejich postupného zředění, ke kterému dochází během transportu spermie v samičím reprodukčním traktu, vede zřejmě k rozpadu multimerů až na úroveň monomeru, což může mít fyziologický význam, například v regulaci zmíněného lipidového efluxu [51,59,60]. Vliv koncentrace je mj. zajímavý proto, že výsledky v literatuře uváděných experimentů (např. indukce kapacity interakcí s HDL [59] nebo heparinem [72]) byly získány při koncentracích proteinu daleko pod hodnotou, kdy se multimerní forma v našich výsledcích již ztrácí a jež nejsou fyziologické.

Vliv některých faktorů na agregaci proteinů (např. přítomnost vápníku, fosforylcholinu, vliv pH nebo iontové síly) je v zásadě ve shodě s literaturou [50]. Překvapivý je výrazný vliv síranových aniontů, a to při nízké koncentraci. Jestliže by měl tento efekt spočívat např. ve vyvázání některých iontů v roztoku, pak měla mít podobný

efekt i přítomnost EDTA, fosfátů nebo vysoká koncentrace citrátu, což se nepotvrdilo, spíše byl jejich efekt opačný (kap. 3.4.1, str. 49).

Další zajímavé výsledky přineslo studium jednotlivých izolovaných frakcí (tedy vysokomolekulární, multimerní a monomerní) po separaci BSP na Sephadexu G-150 (kap. 3.5, str. 61). Skutečnost, že zůstávají ve stejném agregačním stavu i po afinitní chromatografii na DEAE-Sephadexu, vypovídá o silné tendenci setrvávat v daných formách a vede nás k myšlence, že existuje možná rozdílná distribuce různých glykoform PDC-109 do jednotlivých frakcí. Výsledky SDS elektroforézy skutečně ukazují na odlišné složení glykoform ve formě monomeru od ostatních frakcí (obr. 3.20, str. 63). Zatímco u agregovaných forem a v nerozděleném PDC-109 [34] je majoritní glykosylovaná forma, ve frakci odpovídající monomeru je situace opačná. To dokazuje náš další experiment, ve kterém jsme zjistili až o 50 % nižší obsah neutrálních cukrů ve frakci III oproti ostatním frakcím (viz obr. 3.21, str. 64). To patrně svědčí o neochotě neglykosylované formy PDC-109 asociovat za vzniku vyšších struktur. Rozdílné chování v prostředí nativní elektroforézy (obr. 3.21, str. 64) dále potvrzuje odlišné vlastnosti různých glykoform.

Deglykosylační experimenty s PDC-109 ukazují, že glykosylace zřejmě ovlivňuje jeho agregační stav (kap. 3.6, str. 68) a potvrzují tak naše výsledky. Z literatury se sice dozvídáme, že enzymatická deglykosylace nemá na agregaci PDC-109 vliv [50], nicméně tak bylo vyvozeno pouze z diskuze vlivu glykosylace na tvorbu vysokomolekulárních agregátů. Tady se naše výsledky shodují, zdá se dokonce, že jsou tyto formace u deglykosylovaného preparátu posíleny (kap. 3.6, str. 68).

Vliv glykosylace se tedy liší u jednotlivých frakcí. Vysokomolekulární forma existuje i v deglykosylovaném preparátu, ale analýza frakce I po separaci na Sephadexu přitom ukazuje na majoritní zastoupení glykosylované formy, odpovídající poměru glykoform PDC-109 v semenné plazmě [34]. To naznačuje, že interakce vedoucí k formaci vysokomolekulárních agregátů je na glykosylaci v podstatě nezávislá. Zatímco PDC-109 ve formě multimeru se po deglykosylaci téměř neobjevuje. To naznačuje, že k interakci, zodpovědné za multimerizaci, je nezbytná glykosylovaná forma PDC-109 (což je ve shodě se zjištěním, že frakce monomeru obsahuje převážně neglykosylovanou formu). Zdá se tedy, že polydisperzita PDC-109 je výsledkem dvou odlišných interakcí. To je v souladu s hypotézou, učiněnou na základě výsledků mé bakalářské práce [101], že mechanismus agregace BSP je závislý částečně na interakcích proteinové kostry a částečně na interakci jejích sacharidových komponent. Ze srovnání chromatografií deglykosylova-

ného PDC-109 s parciálně deglykosylovaným preparátem pomocí neuraminidasy vyplývá skutečnost, že formace oligomerů je závislá na glykosylaci až od úrovně disacharidu a výš, neboť po desializaci se PDC-109 v multimerní formě stále objevuje. To je rovněž v souladu s našimi předchozími výsledky [101].

V předkládané práci se nám tedy podařilo nalézt některé faktory, ovlivňující agregaci PDC-109 a BSP. Abychom zjistili, jak agregace ovlivňuje nativní interakce PDC-109 a BSP v průběhu fertilizace, byly provedeny vazebné studie metodou ELBA. V případě vazby heparinu s PDC-109 byla pozorována výrazně zvýšená interakce v přítomnosti dvojmocných kationtů (při vyšších koncentracích), ve které je zřejmě favorizována formace monomerů a dimerů (kap 3.3.1, str. 44). To je v soulase s [67], že frakce heparin vázajících proteinů býčí semenné plazmy se vyskytují v rozmezí M_r 10000 – 60000. Interakce PDC-109 i BSP z monomerní frakce s látkami tekutin oviduktu je naopak výrazně oslabena v porovnání s ostatními frakcemi (kap 3.5, str. 61) a je též výrazně oslabena po deglykosylaci (kap. 3.6, str. 68), takže zřejmě k ní dochází preferenčně s PDC-109 ve formě dimeru a výš. Z výsledků fluorescenční mikroskopie (kap. 3.5, str. 61) se zdá, že každá frakce preferuje jinou oblast membrány spermie při navázání. To je z fyziologického hlediska velmi zajímavé a nevíme o tom, že by již podobný experiment byl publikován. V případě nerozděleného PDC-109 se totiž jednotlivé frakce vážou nediferenciovaně a výsledkem je zhruba rovnoměrné pokrytí membrány spermie PDC-109 (kap. 3.5, str. 61).

Překvapivým výsledkem bylo, že se během afinitní chromatografie společně s PDC-109 kopurifikuje proteasa, zřejmě akrosin, a pravděpodobně odštěpuje specificky část PDC-109. Akrosin se v malé míře nachází též na povrchu membrány [11] a přichází tak zřejmě do kontaktu s PDC-109. Modifikace odštěpením části proteinu by mohla být zahrnuta v mechanismu přerušení vazby spermie na epitel oviduktu. Tento mechanismus není znám [48], ale výsledky ukazují spíše právě na modifikaci proteinu, než jeho odsun [48].

V této práci se nám tedy podařilo prokázat, že agregací stav PDC-109 patrně ovlivňuje jeho vazebné vlastnosti a jeho polydisperzní povaha tak přispívá k multifunkční roli, kterou zastává v průběhu fertilizace.

5. Závěr

- 290 mg PDC-109 bylo purifikováno z 1200 mg BSP metodou afinitní chromatografie na DEAE-Sephadexu A-25, značná část se však zřejmě nenavázala, což ukazuje na vysoký obsah PDC-109 v semenné plazmě
- podařilo se nám najít faktory ovlivňující agregaci BSP a PDC-109: přítomnost vápenatých iontů, EDTA, citrát, fosforylcholin, vysoká iontová síla a nízké pH podporují disagregaci, zatímco nízká iontová síla, některé jednoduché cukry a síranové anionty působí opačně
- zjistili jsme, že koncentrace výrazně ovlivňuje agregační stav obou vzorků, což může mít fyziologický význam, vzhledem k vysokým nativním koncentracím těchto proteinů
- analýzou jednotlivých frakcí jsme objevili, že tendence setrvávat v daných formách je patrně dost silná
- zjistili jsme, že distribuce glykoforem PDC-109 do těchto frakcí se navzájem liší, a to tak, že ve formě monomeru se nachází převážně neglykosylovaný protein, zatímco v ostatních frakcích je tomu naopak
- deglykosylačními experimenty jsme objevili vliv glykosylace na agregaci PDC-109
- metodou ELBA a fluorescenční mikroskopie jsme zjistili, že agregační stav PDC-109 a BSP moduluje jeho vazebné vlastnosti

6. Seznam použitých zkratek

AA	- akrylamid
ABTS	- 2,2'-azino-bis(2-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AK	- aminokyselina
ApoA-I	- apolipoprotein A-I
APS	- persíran amonný (z angl. <u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfate)
ATP	- adenosin trifosfát
aSFP	- <u>a</u> cid <u>S</u> eminal <u>F</u> luid <u>P</u> rotein
Avidin-HRP	- avidin značený křenovou peroxidasou
Bis(AA)	- N,N'-methylen-bisakrylamid
BSA	- hovězí sérový albumin (z angl. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
BSP	- v kap. 1: skupina proteinů: PDC-109, BSP-A3 a BSP-30-kDa - v ostatních kap.: kompletní proteiny býčí semenné plazmy
cAMP	- cyklický adenosin monofosfát
CBB	- <u>C</u> oomassie <u>B</u> rilliant <u>B</u> lue
CEF	- <u>C</u> auda <u>E</u> pididymal <u>F</u> luid
Cys	- α -L-cystein
DMF	- N,N'-dimethylformamid
EDTA	- kyselina ethylendiamintetraoctová
ELBA	- z angl. <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>B</u> inding <u>A</u> ssay
FF	- <u>F</u> ollicular <u>F</u> luid
FITC	- fluorescein isothiokyanát
GAG	- glykosaminoglykan
HDL	- z angl. <u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
ChS	- chondroitin sulfát
Ins	- inositol
L-Fuc	- L-fukosa
D-Fru	- D-fruktosa
D-Gal	- D-galaktosa

D-Glc	- D-glukosa
DEAE-Sephadex	- diethylaminoethyl-Sephadex
D-Man	- D-mannosa
ME	- merkaptoethanol
MK	- mastná kyselina
M _r	- relativní molekulová hmotnost
NHS-biotin	- <i>N</i> -hydroxysukcinimidobiotin
OFA	- <u>O</u> viductal <u>F</u> luid <u>A</u> lbumin
OPN	- osteopontin
PAF	- <u>P</u> latelet <u>A</u> ctivating <u>F</u> actor
PLA ₂	- fosfolipasa A2
PBS	- fosfátem tlumený fyziologický roztok
PC	- Fosfatidylcholin
PE	- Fosfatidylethanolamin
PI	- Fosfatidylinositol
PrC	- Fosforylcholin
PS	- Fosfatidylserin
SDS	- dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	- <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate – <u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
TBS	- fyziologický roztok tlumený pomocí Tris
TCA	- trichloroctová kyselina
TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TD	- látky tekutin dělohy
Thr	- α-L-threonin
TO	- látky tekutin oviduktu
Tris	- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	- α-L-tryptofan
Tyr	- α-L-tyrosin
ZP	- zona pellucida

7. Literatura

1. Matoušek J.: Anatomie a histologie samčích pohlavních orgánů, v knize Biologie rozmnožování hospodářských zvířat, SZN, Praha, 1964
2. Marvan M. a kol.: Morfologie hospodářských zvířat, 3. vydání, Brázda, s.r.o., Praha, 2003
3. Holstein A.F., Schulze W., Davidoff M.: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1:107 (2003)
4. Cabbalero J., Frenette G., Sullivan R.: Posttesticular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int* 2011: 757194 (2010)
5. Jaiswal B. S., Eisenbach M.: Capacitation, v knize Fertilization (Hardy D. M., ed), Academic Press Inc., San Diego, 2002
6. Parrish J.J., Susko-Parrish J., Winer M.A., First N.L.: Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38: 1171-80 (1988)
7. Eisenbach M.: Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet* 25: 87-94 (1999)
8. Bahat A., Eisenbach M.: Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol* 252: 115-19 (2006)
9. Cardullo R.A., Thaler C.D.: Function of the Egg's Extracellular Matrix, v knize Fertilization (Hardy D. M., ed), Academic Press Inc., San Diego, 2002
10. Topper E.K., Kruijt L., Calvete J., Mann K., Töpfer-Petersen E., Woelders H.: Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 46: 344-50 (1997)
11. Yanagimachi R.: Mammalian Fertilization, v knize The Physiology of Reproduction, 2nd edition (Knobil E., Neill J.D., eds), Raven Press, Ltd., New York , 1994
12. Evans J.P., Florman H.M.: The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol* 4: 57-63 (2002)
13. Assumpção T.I., Fontes W., Sousa M.V., Ricart C.A.: Proteome analysis of Nelore bull (*Bos taurus indicus*) seminal plasma. *Protein Pept Lett* 12: 813-7 (2005)
14. Kelly V.C., Kuy S., Palmer D.J., Xu Z., Davis S.R., Cooper G.J.: Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics* 6: 5826-33 (2006)

15. Einspanier R., Amselgruber W., Sinowatz F., Henle T., Röpke R., Schams D.: Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). *J Reprod Fertil* 98: 241-4 (1993)
16. Schöneck C., Braun J., Einspanier R.: Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 45: 633-42 (1996)
17. Marquínez A.C., Andretta A.M., Chen J.S., Menesini Chen M.G., Wolfenstein Todel C., Scacciati de Cerezo J.M.: Inhibition of acrosine-like protease activity by a lectin affinity chromatographic bovine seminal plasma fraction containing the PDC-109 and aSFP proteins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 746: 141-50 (2000)
18. Tedeschi G., Oungre E., Mortarino M., Negri A., Maffeo G., Ronchi S.: Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem* 267: 6175-9 (2000)
19. Moura A.A.: Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin. *Anim Reprod* 2: 3-10 (2005)
20. Shivaji S.: Seminalplasmin: a protein with many biological properties. *Biosci Rep* 8: 609-18
21. Assumpção T.I., Torres R.A., Jr., Sousa M.V., Ricart C.A.: Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57: 55-61 (2005)
22. Moura A.A., Koc H., Chapman D.A., Killian G.J.: Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl* 27: 201-11 (2006)
23. Gerena R.L., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman D.A., Killian G.J.: Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod* 58: 826-33 (1998)
24. Roncoletta M., Morani Eda S., Esper C.R., Barnabe V.H., Franceschini P.H.: Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 91: 77-87 (2006)
25. Moura A.A., Chapman D.A., Koc H., Killian G.J.: Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl* 27: 534-41 (2006)

26. Desnoyers L., Thérien I., Manjunath P.: Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev* 37: 425-35 (1994)
27. Manjunath P., Sairam M.R., Uma J.: Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biosci Rep* 7: 231-8 (1987)
28. Manjunath P., Sairam M. R.: Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 241: 685-92 (1987)
29. Esch F.S., Ling N.C., Böhlen P., Ying S.Y., Guillemin R.: Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 113: 861-7 (1983)
30. Calvete J.J., Mann K., Schäfer W., Sanz L., Reinert M., Nessau S., Raida M., Töpfer-Petersen E.: Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 310: 615-22 (1995)
31. Salois D., Ménard M., Paquette Y., Manjunath P.: Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholin and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma. *Biol Reprod* 61: 288-97 (1999)
32. Fan J., Lefebvre J., Manjunath P.: Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375: 63-74 (2006)
33. Manjunath P., Lefebvre J., Jois P.S., Fan J., Wright M.W.: New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod* 80: 394-7 (2009)
34. Calvete J.J., Raida M., Sanz L., Wempe F., Scheit K.H., Romero A., Töpfer-Petersen E.: Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa. *FEBS Lett* 350: 203-6 (1994)
35. Nauc V., Manjunath P.: Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* 63: 1058-66 (2000)
36. Manjunath P., Chandonnet L., Leblond E., Desnoyers L.: Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 50: 27-37 (1993)
37. Seidah N.G., Manjunath P., Rochemont J., Sairam M.R., Chrétien M.: Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to collagen-binding domain of fibronectin. *Biochem J* 243: 195-203 (1987)

38. Gerwig G.L., Calvete J.J., Töpfer-Petersen E., Viegant J.F.: The structure of the O-linked carbohydrate chain of bovine seminal plasma protein PDC-109 revised by ¹H-NMR spectroscopy. A correction. *FEBS Lett* 387: 99-100 (1996)
39. Calvete J.J., Mann K., Sanz L., Raida M., Töpfer-Petersen E.: The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 399: 147-52 (1996)
40. Bányai L., Trexler M., Koncz S., Gyenes M., Sipos G., Patthy L.: The collagen-binding site of type-II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin. *Eur J Biochem* 193: 801-6 (1990)
41. Manjunath P., Thérien I.: Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53: 109-19 (2002)
42. Wah D.A., Fernández-Tornero C., Sanz L., Romero A., Calvete J.J.: Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure* 10: 505-14 (2002)
43. Gwathmey T.M., Ignatz G.G., Mueller J.L., Manjunath P., Suarez S.S.: Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 75: 501-7 (2006)
44. Chandonnet L., Roberts K.D., Chapdelaine A., Manjunath P.: Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 26: 313-18 (1990)
45. Liberda J., Tichá M., Zralý S., Švecová D., Věžník Z.: Interaction of bull, stallion and boar seminal plasma proteins and sperms with acidic polysaccharides. *Folia Biol (Praha)* 44: 177-83 (1998)
46. Manjunath P., Marcel Y.L., Uma J., Seidah N.G., Chrétien M., Chapdelaine A.: Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 264: 16853-7 (1989)
47. Liberda J., Kraus M., Ryšlavá H., Vlasáková M., Jonáková V., Tichá M.: D-fructose-binding proteins in bull seminal plasma: isolation and characterization. *Folia Biol (Praha)* 47: 113-9 (2001)
48. Ignatz G.G., Lo M.C., Perez C.L., Gwathmey T.M., Suarez S.S.: Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 64: 1806-11 (2001)

49. Liberda J., Ryšlavá H., Jelínková P., Jonáková V., Tichá M.: Affinity chromatography of bull seminal proteins on mannan-Sepharose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780: 231-9 (2002)
50. Gasset M., Saiz J.L., Laynez J., Sanz L., Gentzel M., Töpfer-Petersen E., Calvete J.J.: Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *Eur J Biochem* 250: 735-44 (1997)
51. Desnoyers L., Manjunath P.: Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267: 10149-55 (1992)
52. Müller P., Erlemann K.R., Müller K., Calvete J.J., Töpfer-Petersen E., Marienfeld K., Hermann A.: Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys* 27: 33-41 (1998)
53. Thomas C.J., Anbazhagan V., Ramakrishnan M., Sultan N., Surolia I., Swamy M.J.: Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study. *Biophys J* 84: 3037-44 (2003)
54. Kim H.J., Choi M.Y., Kim H.J., Llinás M.: Conformational dynamics and ligand binding in the multi-domain protein PDC-109. *PLoS One* 5: e9180
55. Ramakrishnan M., Anbazhagan V., Pratap T.V., Marsh D., Swamy M.J.: Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy. *Biophys J* 81: 2215-25 (2001)
56. Anbazhagan V., Swamy M.J.: Thermodynamics of phosphorylcholine and lysophosphatidylcholine binding to the major protein of bovine seminal plasma, PDC-109. *FEBS Lett* 579: 2933-38 (2005)
57. Greube A., Müller K., Töpfer-Petersen E., Herrmann A., Müller P.: Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 40: 8326-34 (2001)
58. Lassiseraye D., Courtemanche L., Bergeron A., Manjunath P., Lafleur M.: Binding of bovine seminal plasma protein BSP-A1/-A2 to model membranes: lipid specificity and effect of the temperature. *Biochim Biophys Acta* 1778: 502-13 (2008)
59. Thérien I., Moreau R., Manjunath P.: Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 59: 768-76 (1998)

60. Thérien I., Moreau R., Manjunath P.: Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61: 590-8 (1999)
61. Tannert A., Kurz A., Erlemann K.R., Müller K., Herrmann A., Schiller J., Töpfer-Petersen E., Manjunath P., Müller P.: The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet. *Eur Biophys J* 36: 461-75 (2007)
62. Tannert A., Töpfer-Petersen E., Herrmann A., Müller K., Müller P.: The lipid composition modulates the influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on membrane stability. *Biochemistry* 46: 11621-9 (2007)
63. Müller P., Greube A., Töpfer-Petersen E., Herrmann A.: Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids. *Eur Biophys J* 6: 438-47 (2002)
64. Scolari S., Müller K., Bittman R., Herrmann A., Müller P.: Interaction of mammalian seminal plasma protein PDC-109 with cholesterol: implications for a putative CRAC domain. *Biochemistry* 49: 9027-31 (2010)
65. Damai R.S., Anbazhagan V., Rao K.B., Swamy M.J.: Fluorescence studies on the interaction of choline-binding domain B of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109 with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1794: 1725-33 (2009)
66. Calvete J.J., Campanero-Rhodes M.A., Raida M, Sanz L.: Characterization of the conformation and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Lett* 444: 260-4 (1999)
67. Jelínková P., Ryšlavá H., Liberda J., Jonáková V., Tichá M.: Aggregated forms of bull seminal plasma proteins and their heparin-binding activity. *Collect Czech Chem Commun* 69: 616-630 (2004)
68. Manjunath P. v knize *Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance* (Sairam M.R., and Atkinson L.E., eds) p. 49-61, World Scientific Publishing Co., Singapore (1984)
69. Clegg E.D., Foote R.H.: Phospholipid composition of bovine sperm fractions, seminal plasma and cytoplasmic droplets. *J Reprod Fert* 34: 379-83 (1973)
70. Gwathmey T.M., Ignatz G.G., Suarez S.S.: PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 69: 809-15 (2003)

71. Ignatz G.G., Cho M.Y., Suarez S.S.: Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod* 77: 906-13 (2007)
72. Thérien I., Soubeyrand S., Manjunath P.: Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol Reprod* 57: 1080-8 (1997)
73. Thérien I., Bleau G., Manjunath P.: Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod* 52: 1372-9 (1995)
74. Thérien I., Bousquet D., Manjunath P.: Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 65: 41-51 (2001)
75. Ehrenwald E., Foote R.H., Parks J.E.: Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 25: 195-204 (1990)
76. Uquz C., Vredenburg W.L., Parrish J.J.: Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod* 51: 1031-9 (1994)
77. Storey B.T.: Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol* 52: 427-37 (2008)
78. Lee, C.N., Handrow R.R., Lenz R.W., Ax R.L.: Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa in vitro. *Gamete Res* 12: 345-355 (1985)
79. Thérien I., Bergeron A., Bousquet D., Manjunath P.: Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 71: 97-106 (2005)
80. Manjunath P., Soubeyrand S., Chandonnet L., Roberts K.D.: Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J* 303: 121-8 (1994)
81. Sánchez-Luengo S., Aumüller G., Albrecht M., Sen P.C., Röhm K., Wilhelm B.: Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. *J Androl* 25: 234-44 (2004)
82. Revah I., Gadella B.M., Flesch F.M., Colenbrander B., Suárez S.S.: Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol Reprod* 62: 1010-5 (2000)

83. Bergeron A., Crête M.H., Brindle Y., Manjunath P.: Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70: 708-17 (2004)
84. Calvette J.J., Varela P.F., Sanz L., Romero A., Mann K., Töpfer-Petersen E.: A procedure for the large scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. *Protein Expr Purif* 8: 48-56 (1996)
85. Rothschild Lord, Barnes H.: Constituents of bull seminal plasma. *J Exp Biol* 31: 561-72 (1954)
86. Tuncer P.B., Tasdemir U., Ozgurta T.: Comparision od spermatological and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turk J Vet Anim Sci* 31: 381-7 (2007)
87. Cragle R.G., Salisbury G.W., Muntz J.H.: Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluids and semen. *J Dairy Sci* 41: 1273-7 (1958)
88. Arver S., Eliasson R.: Zinc and magnesium in bull and boar spermatozoa. *J Reprod Fert* 60: 481-4 (1980)
89. Hartree E. F.: Inositol in seminal plasma. *Biochem* 66: 131–7 (1957)
90. Liberda J., Tichá M., Jonáková V.: Preparation of fluorescein-labelled and biotinylated derivatived of polysaccharides for lectin-saccharide binding studies. *Biotechnol Tech* 11: 265-7 (1997)
91. Jobbagy A., Kiraly K.: Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim Biophys Acty* 124: 166-75 (1966)
92. Kobata A., Takasaki S.: Structural characterization of oligosaccharides from glycoproteins v knize *Glycobiology – A Practical Approach*, IRL Press, 1993
93. Laemli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophag T4. *Nature* 227: 680-5 (1970)
94. Kračmerová J.: Optimalizace „červené“ nativní elektroforézy. Bakalářská práce, PŘF UK, 2008
95. Dráb T., Kračmerová J., Tichá I., Hanzlíková E., Tichá M., Liberda J.: Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes. *J Sep Sci* 34: 1692-5 (2011)

96. Dráb T., Kračmerová J., Tichá I., Hanzlíková E., Tichá M., Ryšlavá H., Doubnerová V., Maňásková-Postlerová P., Liberda J.: Native red electrophoresis – a new method suitable for separation of native proteins. *Electrophoresis* 32, 3597-9 (2011)
97. Gromova I., Celis J.E.: Protein detection in gels by silver staining: a procedure compatible with mass-spectrometry v knize *Cell Biology: A laboratory handbook*, Academic Press, 2006
98. Wilson M.J., Norris H., Kapoor D., Woodson M., Limas C., Sinha A.A.: Gelatinolytic and caseinolytic proteinase activities in human prostatic secretions. *J Urol* 149: 653-8 (1993)
99. Dubois M., Gilles K.: A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168: 167 (1951)
100. Bradford M.M.: Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 236: 248-54 (1976)
101. Boháček H.: Vliv glykosylace na agregaci býčí semenné plazmy. *Bakalářská práce*, PřF UK, 2007